



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

Giovana Fucina

**Plataforma de cultura celular tridimensional baseada
em nanocelulose bacteriana: foco em linhagem de melanoma**

Florianópolis

2022

Giovana Fucina

**Plataforma de cultura celular tridimensional baseada
em nanocelulose bacteriana: foco em linhagem de melanoma**

Tese submetida ao Programa de Doutorado em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Maique Weber Biavatti

Florianópolis

2022

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

Fucina, Giovana

Plataforma de cultura celular tridimensional baseada em nanocelulose bacteriana: foco em linhagem de melanoma / Giovana Fucina ; orientador, Maique Weber Biavatti, 2022. 89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Nanocelulose bacteriana . 3. Células de melanoma humano. 4. Cultura de células 3D. 5. Biopolímeros/Hidrogéis esféricos translúcidos. I. Biavatti, Maique Weber. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Giovana Fucina

**Plataforma de cultura celular tridimensional baseada
em nanocelulose bacteriana: foco em linhagem de melanoma**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 24 de agosto de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa. (UFSC - Membro Titular)

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho. (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas. (UFPR – Membro Titular)

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

Profª. Dra. Maique Weber Biavatti – Orientadora

Profª. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Farmácia

Florianópolis, 24 de agosto de 2022.

Dedico esse trabalho aos meus amores Marcelo e Nina e a minha família que mesmo de longe viveram comigo cada pedacinho desse caminho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pela oportunidade de realização deste trabalho. À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos membros da banca por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho.

Agradeço à Profª. Dra. Maique W. Biavatti, por aceitar caminhar mais uma vez comigo e fazer parte deste processo, orientando e acreditando no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Luismar Marques Porto pela oportunidade de ingressar no estudo da nanocelulose bacteriana, biomaterial promissor pelo qual fiquei encantada mesmo quando não pensava em cursar mais uma pós-graduação. Agradeço pelo tempo que passei no saudoso InteLab, hoje LiEB. À Fernanda Vieira Berti por tudo. Não há palavras que possam descrever sua interferência no curso de minha história até aqui. Sou grata e feliz por ter lhe conhecido.

Ao Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto, pelo abrigo na sala de simulações (Neurolab) e pelos cafés filosóficos e a todos os professores do EQA pelo carinho que sempre me trataram.

Ao Prof. Dr. Rafael Diego Rosa pelas aulas de biologia molecular e ao Prof. Dr. Flavio Henrique Reginatto pelo incentivo emocional muito importante de última hora.

A minha querida amiga Leila Cavalheiro Violin sempre presente, ensinando-me a dar o devido valor ao meu empenho e a reconhecer quem faz parte da minha história. À Lu que ajudou a traduzir as emoções desconhecidas despertadas ao longo dessa jornada.

Em memória a minha madrinha Vilma e prima Neocy (Toco). Findo esse trabalho sem vocês neste plano... logo vocês que tanto me incentivaram. É bem difícil compreender quando a tragédia bate a nossa porta.

Aos colegas de laboratório, em especial à Karina Cesca por todas as cicatrizes, pois com elas contaremos todas as dificuldades superadas. Certamente, foi um capítulo à parte conviver com você. Karla Pollyanna Vieira de Oliveira pela parceria de última hora que se transformou em muitas, muitas horas de trabalho e ótimas discussões. Obrigada pelo apoio! Aos queridos Luiz, Ingrid, Larissa G., Larissa F., Amanda, Layzon e Erlon sempre prontos a me ajudar, mesmo eu estando “do outro lado do túnel”. Ao Marcos Schorner, Maicon, Amandinha, Thalles, Breno, Greicy e Marick que fizeram toda a diferença.

Por fim, de todo meu coração, agradeço pelas orações de minha mãe, apoio de meu pai e incentivo que recebi principalmente de meu esposo Marcelo e filha Nina, cujo tempo roubado espero poder compensar.

“La actividad más importante que un ser humano puede lograr es aprender para entender, porque entender es ser libre”

Baruch Spinoza.

RESUMO

A busca por modelos *in vitro*, que aproximem seus resultados daqueles esperados em estudos clínicos, revela a necessidade de materiais que permitam a cultura celular tridimensional (3D). A nanocelulose bacteriana (BNC) tem sido usada como suporte celular em vários estudos de engenharia de tecidos. O uso da BNC se deve à estrutura nanofibrosa que permite a criação de um microambiente que suporta a cultura de células. As características da estrutura e poros interligados levam à adesão e proliferação de células animais, permitindo também o transporte de oxigênio e nutrientes. Desenvolveu-se uma nova metodologia para a produção de plataformas esféricas translúcidas sintetizadas por *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) sob condições dinâmicas de cultivo em meio mínimo. A composição química e as propriedades físicas das plataformas foram avaliadas. Em seguida, células de melanoma humano (SK-MEL-28) foram encapsuladas nas plataformas e avaliadas pela atividade metabólica, morfologia e capacidade de aderir e proliferar nas Esferas Translúcidas de BNC Ocas (BNC-TS-H) e nas Esferas Translúcidas de BNC Compartimentadas (BNC-TS-C) até 3 dias. Ambas plataformas permitiram adesão e proliferação celular, porém, a BNC-TS-H privilegiou a interação célula-célula, enquanto que a BNC-TS-C mostrou interação célula-matriz. Assim, priorizando os estudos de interação célula-matriz, foram realizados os ensaios com maior densidade celular e maior tempo de cultivo (28 dias), utilizando apenas BNC-TS-C. Esses ensaios revelaram flutuações importantes na atividade metabólica, distintos momentos de interação célula-BNC, e por consequência morfologia e expressão gênica. Os resultados sugerem que o microambiente oferecido pelo arranjo das nanofibras de celulose e o espaço delimitado esférico foram responsáveis pelo destino das células tumorais. As plataformas esféricas translúcidas desenvolvidas poderão ser promissoras para cultura tridimensional.

Palavras-chave: Nanocelulose bacteriana, hidrogéis esféricos translúcidos, células de melanoma humano, cultura de células 3D, biopolímeros.

ABSTRACT

The pursuit for *in vitro* models, which converge expected results in clinical trials, reveals the need for materials that allow 3D cell culture. Bacterial nanocellulose (BNC) has been used as cell support in several tissue engineering studies. The use of BNC is due to the nanofibrous structure, which enables a microenvironment creation that supports cell culture. The characteristics of the structure and also interconnected pores lead to animal cells adhesion and proliferation, providing the transportation of oxygen and nutrients as well. New methodology for the production of translucent spherical platforms synthesized by *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) under dynamic conditions of cultivation in minimal medium was developed. The platforms chemical composition and physical properties were evaluated. Human melanoma cells (SKMEL-28) were encapsulated into the platforms and evaluated by metabolic activity, morphology and their ability on adhering to the Hollow Translucent BNC Spheres (BNC-TS-H) and Compartmentalized Translucent BNC Spheres (BNC-TS-C) up to 3 days. Both platforms allowed cell adhesion and proliferation, however BNC-TS-H favored cell-cell interaction, while BNC-TS-C presented cell-matrix interaction. Thus, prioritizing cell-matrix studies, higher cell density and longer culture time (28 days) assays were performed using only BNC-TS-C. The former assays showed important variation on the metabolic activity, different interaction moments between cell and BNC, and consequently morphology and gene expression. The results suggest the microenvironment offered by cellulose nanofibers arrangement and bounded spherical space were responsible for the fate of tumor cells. The developed translucent spherical platforms may be promising for tridimensional culture.

Keywords: Bacterial nanocellulose, translucent spherical hydrogels, human melanoma cells, 3D cell culture, biopolymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Critérios ABCDE – método criado em 1985 para aumentar a conscientização pública sobre o melanoma.....	22
Figura 2: Estrutura de bastonete da bactéria produtora de BNC, representação esquemática da excreção de BNC pela bactéria e estrutura química da BNC.	34
Figura 3: Representação esquemática das rotas de produção das Esferas Translúcidas de Nanocelulose Bacteriana (BNC-TS), produzidas por <i>Komagataeibacter hansenii</i> (ATCC 23769) 10% (v/v), em meio mínimo de cultura por cinco e três dias a 1,7 Hz sob 26°C.	51
Figura 4: Avaliação físico química de Esferas Translúcidas de Nanocelulose Bacteriana (BNC-TS) produzidas em um agitador rotativo operando a 1,7 Hz por 5 e 3 dias a 26 °C.....	53
Figura 5: Características morfológicas das Esferas Translúcidas de Nanocelulose Bacteriana (BNC-TS).....	55
Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do corte transversal das esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana (BNC-TS).	56
Figura 7: Ensaio MTS, mostrando a atividade metabólica das células SK-Mel-28, cultivadas em amostras de BNC-TS-H e BNC-TS-C, durante 72 h de cultura <i>in vitro</i>	58
Figura 8: Micrografias MEV e imagens microscópicas confocais de células de melanoma humano (SK-MEL-28) cultivadas em BNC-TS-H e BNC-TS-C.	60
Figura 9: Ensaio MTS, mostrando a atividade metabólica das células SK-Mel-28, cultivadas em amostras de BNC-TS-C e Membranas de BNC, durante 28 dias de cultura <i>in vitro</i>	62
Figura 10: Imagens, obtidas por microscopia óptica, das células SK-MEL-28 cultivadas sobre membranas de BNC por 28 dias.....	64
Figura 11: Micrografias MEV de células de melanoma humano (SK-MEL-28) cultivadas nas plataformas BNC-TS-C por 1; 7; 14 e 21 dias.	65
Figura 12: Imagens microscópicas confocais de células de melanoma humano (SK-MEL-28) cultivadas em BNC-TS-C por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.	67
Figura 13: Análise da expressão gênica de células de melanoma humano (SK-MEL-28) semeadas em monocamada (2D) e em plataformas BNC-TS-C (3D), após 3 dias de cultivo.	71
Figura 14: Expressão gênica de células SK-MEL-28 cultivadas na plataforma BNC-TS-C por 28 dias.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais comparações entre 2D e 3D ao estudar as interações do microambiente tumoral	28
Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos modelos 3D.	30
Tabela 3: Marcos selecionados no desenvolvimento de modelos de melanoma cutâneo 3D <i>in vitro</i>	31
Tabela 4: Sequência dos iniciadores utilizados na RT-qPCR.....	48
Tabela 5: Área porosa, diâmetro da fibra na borda e região central do BNC-TS-C e BNC-TS-H, obtidas das imagens MEV analisadas pelo software ImageJ®	57
Tabela 6: Resultados das extrações de RNA das células SK-MEL-28, cultivadas em BNC-TS com 6 mm de diâmetro.	69
Tabela 7: Resultados da extração de RNA total de células SK-MEL-28, cultivadas em BNC-TS e em monocamada (2D).	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ABCDE	Metodologia criada 1985 para aumentar a conscientização pública sobre o melanoma e indicada para reconhecer as manifestações dos tipos de câncer da pele
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BNC	Nanocelulose bacteriana
BNC-TS	Esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana
BNC-TS-C	Esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana que apresentam a região central multicompartimentada
BNC-TS-H	Esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana ocas, com um único espaço interno limitado
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FTIR	Espectrofotometria por Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mM	Milimolar
MTS	[3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4- sulfofenil) -2H-tetrazólio]
nM	Nanomolar
OD	Densidade óptica
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Rpm	rotações por minuto
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
TGA	Análise termogravimétrica
TNM	Sistema de estadiamento para a classificação dos tumores malignos
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	O MELANOMA	18
2.1.1	Fatores de risco.....	20
2.1.2	Diagnóstico e estadiamento	21
2.1.3	Tratamento do melanoma	23
2.1.4	Biologia do melanoma - Fundamentos moleculares	25
2.2	A BUSCA POR MODELOS TRIDIMENSIONAIS DE CULTURA DE CÉLULAS	26
2.2.1	A Nanocelulose Bacteriana (BNC).....	33
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
➤	Estabelecer e padronizar o método de produção das plataformas 3D de nanocelulose sintetizada por <i>Komagataeibacter hansenii</i>	37
➤	Caracterizar a microestrutura e a composição físico-química das plataformas esféricas de nanocelulose obtidas.....	37
➤	Estabelecer os parâmetros de cultura das células SK-MEL-28 (quantidade de células/tempo de cultivo) através do perfil de distribuição volumétrica destas células na microestrutura 3D das plataformas de nanocelulose.	37
➤	Compreender o perfil de crescimento (atividade metabólica) das células de melanoma humano SK-MEL-28 nas matrizes 3D desenvolvidas.	37
➤	Caracterizar o comportamento de adesão e interação das células SK-MEL-28 quando cultivadas na microestrutura 3D desenvolvida.	37
➤	Verificar a expressão gênica de adesão e proliferação das células cultivadas nas plataformas esféricas de BNC.	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	MATERIAIS.....	38

4.2	PRODUÇÃO DAS PLATAFORMAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA	39
4.2.1	Reativação da cepa <i>Komagataeibacter hansenii</i>	39
4.2.2	Rota A para produção do inóculo I	39
4.2.3	Rota B para produção do inóculo II	40
4.2.4	Produção das esferas de nanocelulose bacteriana sob fermentação dinâmica...	40
4.2.5	Produção das membranas de nanocelulose bacteriana sob condições estáticas.	41
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE ESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA.....	41
4.3.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
4.3.2	Espectrofotometria por Infravermelho por Transformada de Fourier ou análise por FTIR	42
4.3.3	Análise termogravimétrica (TGA).....	42
4.3.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry-DSC</i>)	42
4.4	CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO CELULAR NAS PLATAFORMAS DE BNC	42
4.4.1	Cultura celular e semeadura celular nas esferas e membranas de BNC.....	42
4.4.2	Análise de atividade metabólica – Ensaio MTS.....	44
4.4.3	Adesão e morfologia de SK-MEL-28 cultivadas em esferas e membranas de BNC	45
4.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	46
4.5.1	Extração do RNA total das células SK-MEL-28 cultivadas nas esferas de BNC	46
4.5.2	Expressão gênica	47
4.6	ANÁLISE DOS DADOS	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	PRODUÇÃO DAS PLATAFORMAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA	49
5.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DAS ESFERAS TRANSLÚCIDAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA (BNC-TS).....	52

5.3	CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO CELULAR NAS PLATAFORMAS DE BNC	58
5.4	EXPRESSÃO GÊNICA	68
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	75
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

Na busca por novas terapias medicamentosas contra o câncer, o cenário atual mostra baixa correlação entre os resultados obtidos em ensaios pré-clínicos e clínicos. Aproximadamente 8% apenas dos novos medicamentos em desenvolvimento contra o câncer vão além da Fase I dos estudos clínicos (FRICKER, 2008; TONIATTI et al., 2014; HONKALA et al., 2022). Somente 5% das novas moléculas identificadas com potencial terapêutico como prováveis compostos anticancerígenos alcançam bons resultados na Fase III para só então, eventualmente, serem licenciadas (KOLA; LANDIS, 2004). Isso nos faz atentar para as limitações existentes quanto aos métodos utilizados em estudos pré-clínicos e ter em mente que é necessário buscar modelos *in vitro* que aproximem seus resultados daqueles esperados em estudos clínicos (VÖRSMANN et al., 2013; TONIATTI et al., 2014; MARCONI et al., 2018).

Nesse contexto, os modelos de cultura em monocamada ditos bidimensionais (2D) não permitem a mimetização da interação celular, nem decodificam as interações das células com a matriz extracelular (MEC) (FONTOURA et al., 2020). Portanto, seus resultados diferem daqueles observados *in vivo*. Sabe-se que as células tumorais crescem *in vivo* em três dimensões (3D) e manter as interações célula-célula e célula-matriz são fundamentais para uma simulação mais precisa do microambiente tumoral, fenótipos de células cancerígenas, bem como para a consequente resposta terapêutica em modelos *in vitro*. Assim, encontrar um modelo tumoral que possa reproduzir *in vitro* o que ocorre *in vivo* é extremamente relevante (RAVI et al., 2015; BOURLAND; FRADETTE; AUGER, 2018; MARCONI et al., 2018; RYABAYA et al., 2019).

Na busca por reproduzir o microambiente tumoral, os modelos 3D surgem como uma alternativa tanto de menor custo quanto de menor variabilidade quando comparados aos modelos animais (LI et al., 2018; LANGHANS, 2021). Os principais sistemas de cultura 3D disponíveis incluem aqueles amparados por arcabouços (scaffolds) e aqueles baseados em líquidos não aderentes (ZANONI et al., 2016), que podem ou não estar associados a sistemas híbridos baseados em biorreatores ou plataformas multfluídicas (FERREIRA; GASPARELLO; MANO, 2018; KULMS; MEIER, 2018).

Modelos não aderentes incluem esferoides tumorais formados por células auto organizadas em suspensão, uma vez que as interações célula-célula são mais fortes do que as células-substrato (RODRIGUES et al., 2018) e podem ser obtidas por meio de diversas metodologias (CARVALHO et al., 2015). Dentre essas metodologias estão cocultivos celulares

que objetivam imitar o ambiente estromal ou demonstrar a formação de capilares sanguíneos e linfáticos (BOURLAND; FRADETTE; AUGER, 2018; KLICKS et al., 2019). Existem porém preocupações relacionadas à reprodutibilidade dos resultados e ao método de avaliação da eficácia do tratamento utilizado, ambos considerados fonte de variabilidade para o modelo (ZANONI et al., 2016). Apesar da reconhecida contribuição de modelos esféricos não aderentes para a descoberta de novas terapias contra o câncer, a literatura indica que novas abordagens metodológicas têm sido desenvolvidas para complementar esses modelos (ZANONI et al., 2019).

Modelos baseados em *scaffolds* são fabricados com polímeros sintéticos ou naturais que fornecem suporte para o crescimento celular e buscam reproduzir as condições da matriz extracelular (ZANONI et al., 2016; PARK; HUH; KANG, 2021). Embora tenham-se obtidos avanços recentes nos modelos 3D, os pesquisadores ainda discutem qual seria o biomaterial ideal para o *scaffold*, então a busca por melhores estruturas onde as culturas celulares sejam mais viáveis ainda continua (BADEKILA; KINI; JAISWAL, 2021). Dependendo da aplicação na engenharia de tecidos, a disponibilidade de espaço livre dentro da matriz, com boas chances de interações célula-célula e/ou célula-matriz, ainda é um tópico de pesquisa desafiador também do ponto de vista analítico (CORTESI; GIORDANO, 2022).

A nanocelulose bacteriana (BNC) atende aos requisitos de um material para a construção da estrutura que suporta a cultura de células em crescimento 3D. Sintetizado extracelularmente por bactérias do gênero *Komagataeibacter*, que contém celulose sintase em sua membrana citoplasmática, a BNC é uma rede de nanofibras composta por 1% de celulose e 99% de água (HALIB et al., 2019). A BNC é considerada um material promissor, devido à pureza e excelentes propriedades mecânicas, já aplicada no desenvolvimento de dispositivos médicos, engenharia de tecidos, indústria alimentícia, cosméticos, eletrônicos, além de sistemas de liberação controlada de fármacos (RECOUVREUX et al., 2011; PICHETH et al., 2017; KLEMM et al., 2018; SHARMA; BHARDWAJ, 2019; SIONKOWSKA; MEŻYKOWSKA; PIĄTEK, 2019; POPA et al., 2022). As características estruturais da fibra de BNC são muito semelhantes aquelas da matriz extracelular de muitos tecidos. A estrutura porosa permite a criação de um microambiente que favorece a adesão e proliferação de células animais, além de permitir que oxigênio e nutrientes permeiem através de seus poros interligados (BERTI et al., 2013; PICHETH et al., 2017; HALIB et al., 2019).

O melanoma, caracterizado pela proliferação descontrolada de melanócitos, é a principal causa de morte por câncer de pele. A Austrália e Nova Zelândia lideram os índices de

incidência e mortes, para ambos os sexos, por melanoma segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Seus principais fatores de risco estão relacionados à exposição da luz ultravioleta (UV) (LEONARDI et al., 2018) e susceptibilidade genética (RASTRELLI et al., 2014; SCHADENDORF et al., 2015), mas outros fatores como a presença de nevos melanocíticos (pequenas manchas marrons regulares na pele), doenças imunossupressoras, uso de certas medicações e certas infecções mostram sua importância no aparecimento do melanoma (WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2018; CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Melanócitos são células derivadas da crista neural, com origem no tubo neural. São células produtoras de melanina, cujo comportamento migratório, de proliferação e diferenciação sugerem uma explicação do porquê o melanoma ser um dos tipos de câncer mais agressivos, letal devido à capacidade metastática (MORT; JACKSON; PATTON, 2015; SHAIN; BASTIAN, 2016) e resistência aos tratamentos disponíveis até o momento (VÖRSMANN et al., 2013; SCHADENDORF et al., 2015; RYABAYA et al., 2019).

Neste trabalho, propôs-se um método para a produção de esferas translúcidas de nanocelulose sintetizadas por fermentação bacteriana dinâmica, para o desenvolvimento de uma plataforma 3D de melanoma que permita avaliar a interação célula-célula, célula-matriz e estudo do microambiente tumoral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O MELANOMA

A incidência mundial de melanoma em 2018 era de 287.723 casos e tinha sua projeção aumentada em 62,3%, podendo chegar a 466.914 novos casos para 2040 (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019). Nacionalmente, para o triênio 2020-2022, são esperados 4200 novos casos de melanoma em homens e 4250 em mulheres, sendo a região sul do Brasil a mais incidente, quando comparado com as demais regiões do país, tanto para homens quanto para mulheres (INCA, 2020). Os números oficiais divulgam atualmente o melanoma como 17º tipo de câncer mais comum em todo o mundo e, por possuir agressividade metastática, registrou taxa de mortalidade mundial em 2020 de 57.043 óbitos, envolvendo ambos os sexos e todas as idades (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020). As projeções da International Agency for Research on Cancer – IARC estimam agora um cenário de aumento no número de novos casos de melanoma para mais de 500.000 por ano até 2040, podendo chegar a quase 100.000 mortes anuais (ARNOLD et al., 2022).

Ao examinar o impacto econômico envolvido no diagnóstico e tratamento de pacientes com melanoma, encontrou-se cifras importantes para qualquer programa de saúde. Segundo Guy e colaboradores (2012) em 2011 publicavam-se valores na ordem de US\$ 44,9 milhões, para pacientes atendidos pelo sistema de seguros de saúde gerido pelo governo dos Estados Unidos da América (EUA) – MEDICARE, com casos existentes e a US\$ 932,5 milhões entre os casos recentemente diagnosticados em todas as faixas etárias. Considerando as diferentes abordagens para comparações de custo entre países, a Suécia apresentava um custo anual do tratamento do melanoma na ordem de US\$ 3,1 milhões e o Brasil apresentava US\$ 66,9 milhões (GUY et al., 2012). Após as aprovações de imunossuppressores, estudo realizado em pacientes com melanoma irresssecável avançado nos EUA, apontou um custo de US\$ 1,6 milhão para se obter um ano de vida adicional ajustado à qualidade, sem progressão (ALMUTAIRI et al., 2019). Na Holanda o custo total médio de tratamento do melanoma foi de € 89.240, sendo que custo médio mensal por paciente pode variar conforme a abordagem de tratamento (LEENEMAN et al., 2020). Atualmente, além das intervenções cirúrgicas e quimioterapia citotóxica, há imunossuppressores e tratamentos ditos direcionados. Apesar da chegada de novos tratamentos para o melanoma, o fator custo tem imposto desafios à relação custo-efetividade e acessibilidade (GORRY; MCCULLAGH; BARRY, 2020; LEENEMAN et al., 2020).

Identificar os estágios patológicos e clínicos dos pacientes com melanoma influenciará no prognóstico e nos resultados oncológicos, conseqüentemente, na alocação de recursos (DEPERALTA; BOLAND, 2015; CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020).

O melanoma é uma neoplasia que evolui a partir de melanócitos aberrantes (WARD; FARMA, 2017). Melanócitos são células derivadas da crista neural que, durante o desenvolvimento embrionário, devido à alta capacidade de migração, colonizam principalmente a epiderme basal, folículos capilares, superfícies mucosas, meninges e úvea. Portanto, o melanoma pode ocorrer não somente na pele, mas pode surgir em outros locais para onde as células da crista neural migram (SHAIN; BASTIAN, 2016; LEONARDI et al., 2018; CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020; HEISTEIN; ACHARYA, 2020). Assim, considerando-se o local de apresentação, o melanoma pode ser ou não cutâneo.

O melanoma cutâneo representa mais de 90% de todo o melanoma diagnosticado, portanto, de grande importância clínica, e cujas células (imortalizadas) foram utilizadas nesta pesquisa. De acordo com padrão de crescimento (vertical e radial), características clínicas como localização do tumor e idade do paciente, podem ser citados como os principais subtipos histológicos de melanoma cutâneo (CHEN et al., 2013; WARD; FARMA, 2017; NAKAMURA; FUJISAWA, 2018; CARR; SMITH; WERNBERG, 2020):

- **melanoma de espalhamento superficial** (70% dos casos): é o tipo mais comum de melanoma, surge de um nevo existente e estabelece o crescimento lateral (radial) antes que o crescimento vertical (invasivo) ocorra;
- **melanoma nodular** (15% a 30% dos casos): é caracterizado pela ausência de uma fase de crescimento radial, e provoca lesões elevadas ou polipoides de rápido aumento, geralmente azuis ou pretas, exibindo uma fase vertical robusta;
- **melanoma do lentigo maligno** (4% a 10% dos casos): menos comum, geralmente demonstra progressão lenta e ocorre mais em pacientes idosos com pele cronicamente exposta ao sol (face, cabeça). Apresenta-se como uma pequena mácula parecida com sardas que com o tempo cresce, fica mais escura, assimétrica e exibe uma fase de crescimento vertical;
- **melanoma acrolentiginoso** (1-7% nos caucasianos e 50% em asiáticos): incidência maior em pacientes de pele mais escura, cujas lesões surgem mais comumente nas palmas das mãos, plantas dos pés, subungueal;

- **melanoma desmoplásico** (4% dos casos): apesar de não ser considerado um tipo histológico de melanoma (CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020), trata-se de uma neoplasia rara e desafiadora em termos de diagnóstico. Por ser uma variante do melanoma de células fusiformes, é encontrado em peles cronicamente expostas ao sol que apresentam maior tendência de crescimento local, persistente e com metástases nodais menos frequentes.

2.1.1 Fatores de risco

Por possuir alto potencial metastático, o prognóstico, bem como os resultados oncológicos dependem muito do estágio em que o melanoma é descoberto (CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020). Assim, dentre as diretrizes da prática clínica para o diagnóstico do melanoma de pele estão a avaliação regular da pele e a proteção solar. Isto porque os fatores de risco mais comuns estão relacionados com (SCHADENDORF et al., 2015; INCA, 2016; CARR; SMITH; WERNBERG, 2020):

a) exposição à radiação ultravioleta, seja ela de origem natural ou artificial, que danifica o ácido desoxirribonucleico (DNA) das células da pele. É relevante se considerar o histórico de queimaduras solares, que podem traduzir a intermitência de exposição, além do que, o histórico de queimaduras solares na infância está associado ao maior risco. Quanto à radiação ultravioleta artificial inclui-se o uso de câmaras de bronzeamento, uma vez que a quantidade de radiação recebida durante o uso desses equipamentos é significativamente maior em comparação à exposição durante atividades externas comuns;

b) presença de nevos, melanocítico ou displásico, que são acúmulos benignos de melanócitos ou células do nevo, podendo ser congênitos ou adquiridos. São manchas acastanhadas de pelo menos 5 mm de diâmetro, demonstrando ao menos pigmentação variável, assimetria e/ou bordas irregulares ou indistintas. Cerca de 25% dos casos de melanoma correlacionam-se com um nevo preexistente e mutações *BRAF*^{V600E} parecem estar presentes em 80% das vezes (LEONARDI et al., 2018). Ainda, parece haver uma relação positiva entre o risco de melanoma e a quantidade, tamanho e tipo de nevo presente (RASTRELLI et al., 2014; SHAIN; BASTIAN, 2016);

c) idade avançada e estados imunossupressores, assim como o uso de determinados medicamentos, como o psoraleno (fotoquimioterapia);

d) propensão genética e histórico familiar de melanoma, considera as anormalidades genéticas mais comuns aquelas que se relacionam com mutações no inibidor da cinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A* ou p16), um supressor tumoral, ou mais raramente com a mutação na cinase dependente de ciclina 4 (*CDK4*). A predisposição genética se apresenta em pacientes com idade inferior a 40 anos, ou com histórico familiar de retinoblastoma familiar, síndrome do câncer de Li-Fraumeni e síndrome de Lynch tipo II (SCHADENDORF et al., 2015; LEONARDI et al., 2018);

e) fenótipos de pele e olhos claros, com cabelos ruivos ou loiros, ou ser albino tem risco aumentado de melanoma, pois apresentam baixa pigmentação e, portanto, sensibilidade aumentada à radiação ultravioleta. Essas características correlacionam-se com os polimorfismos do gene do receptor da melanocortina 1 (*MC1R*) e aumentam o risco de desenvolver melanoma em 50%;

f) condição sócio econômica, onde estádios mais graves de melanoma são identificados em pacientes mais vulneráveis economicamente (SCHADENDORF et al., 2015; CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

2.1.2 Diagnóstico e estadiamento

Os caucasianos têm dez vezes mais chances de desenvolver o melanoma de pele, tendo países como a Austrália e Nova Zelândia como líderes; já pacientes não-caucasianos têm os piores prognósticos, pois apresentam estágio mais avançado de melanoma (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

Uma das formas adotadas para se verificar precocemente a presença de melanoma é a observação dos principais sinais e sintomas apresentados pelos critérios ABCDE (FRIEDMAN; RIGEL; KOPF, 1985) (**Figura 1**). Esses critérios foram criados em 1985 para aumentar a conscientização pública sobre o melanoma e podem direcionar a avaliação de características de pintas e sinais (INCA, 2016; CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Clinicamente, através da dermatoscopia (**Figura 1**), técnica não invasiva que utiliza um dispositivo óptico portátil, aplicada por especialista, é possível visualizar cores, estruturas e padrões em lesões cutâneas imperceptíveis a olho nu. Essas imagens também podem ser digitalizadas e compor, ao longo do tempo, um dossiê dermatológico. Este método demonstrou reduzir procedimentos cirúrgicos desnecessários e promoveu um aumento de 90% na detecção dos melanomas através das

inspeções clínicas realizadas por dermatologistas. A clínica médica ainda dispõe de outras ferramentas de imagem para auxiliar na diferenciação de melanoma e seus precursores de lesões benignas. Dentre elas a microscopia confocal a laser de refletância *in vivo*, análises digitais multiespectrais auxiliadas por computador e espectroscopia de impedância elétrica (SCHADENDORF et al., 2018).

Figura 1: Critérios ABCDE – método criado em 1985 para aumentar a conscientização pública sobre o melanoma.



Legenda: (I) Critérios ABCDE e os aspectos superficiais de lesões cutâneas por dermatoscopia para detecção de câncer de pele (II). a) Lesão cutânea de 13x7 mm, mostrando bordas irregulares e variação de cor. b) Nevo melanocítico benigno, mostrando no destaque a distribuição regular das linhas pigmentadas e hipopigmentadas. c) Lesão cutânea simétrica de 5x3 mm com centro escuro. d) Presença de pseudópodes característicos de melanoma. No destaque os pseudópodes mostram sua projeção bolhosa, confirmada pela histopatologia como melanoma *in situ* surgido de um nevo melanocítico composto. Adaptado de SCHADENDORF et al (2015) e CARR; SMITH; WERNBERG (2020).

Após a avaliação clínica física do paciente, a revisão histopatológica é a base do diagnóstico dos melanomas cutâneos e o estadiamento patológico o indicador mais importante de prognóstico (WARD; FARMA, 2017; CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020). A avaliação desses parâmetros permite definições aproximadas relativas ao tratamento.

Para avaliação histopatológica, a biópsia adequada da lesão, que pode ser excisional ou parcial, deve garantir massa tecidual suficiente para diferenciar lesões benignas de lesões malignas de modo que se possa incluir dados no relatório histológico sobre a atipia citológica, celularidade amplificada e o número de figuras mitóticas dérmicas (WARD; FARMA, 2017).

Dentre os objetivos da biópsia está a determinação do índice de Breslow (mm), que verifica a profundidade da invasão, determinando a espessura do tumor e os níveis anatômicos

de Clark. O índice de Breslow considera o melanoma fino quando as medidas são menores ou iguais a 1 mm, melanoma moderado ou intermediário para medidas de 1 a 4 mm e melanoma espesso que, geralmente, requer biópsia de linfonodo para medidas maiores que 4 mm (CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020).

Nível de Clark mede o nível de invasão das células de melanoma, sendo considerado (CLARK et al., 1969; HEISTEIN; ACHARYA, 2020):

- nível I para células que estão apenas na epiderme (melanoma *in situ*);
- nível II para células de melanoma que invadem a camada basal e estão na derme papilar;
- nível III são células que preenchem a derme papilar;
- nível IV para aquelas células de melanoma que envolvem a derme reticular;
- nível V quando as células de melanoma envolvem a gordura subcutânea.

O sistema de estadiamento patológico mais usado para o melanoma é o sistema **TNM** do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que se baseia em três informações principais: espessura do tumor e presença de ulcerações (estádio T; estadiamento Breslow), envolvimento linfonodal (estádio N) em que se determina o número de linfonodos comprometidos, e a presença de metástases (estádio M) e classificação da localização, sendo os locais mais comuns de disseminação das metástases os pulmões, fígado, cérebro, ossos e outro local na pele. Números e letras crescentes posteriores às letras T- N- M indicam estádios mais avançados do melanoma. O estágio dito 0 (zero) é reservado para designar o melanoma *in situ*, ou seja, o câncer está confinado à epiderme e não se espalhou para linfonodos próximos. O melanoma sem metástases nodais ou distantes é classificado como estágio I ou estágio II, conforme a profundidade da invasão vertical. O estágio III inclui pacientes com metástase linfonodal macroscópica ou microscópica, e o estágio IV inclui pacientes com evidência de metástase distante (WARD; FARMA, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019a).

2.1.3 Tratamento do melanoma

O tratamento do melanoma varia de acordo com tamanho e estadiamento do tumor, podendo ser indicadas, além de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, imunoterapia e terapêutica alvo. O objetivo do tratamento é o controle local das células aberrantes e quando

possível evitar a disseminação, portanto a cirurgia ainda é a principal ação (HEISTEIN; ACHARYA, 2020).

Desta forma, o estágio zero do melanoma *in situ*, cujos melanócitos atípicos estão confinados à epiderme, requer cirurgia para remoção da lesão, incluindo margem de pele normal para diminuir as chances de recorrência local. A margem de pele pode chegar de 0,5 a 1,0 cm circundante ao tumor. Estima-se que 5% desses melanomas cresçam lentamente e tornem-se invasivos (QUINTANILLA-DIECK; BICHAKJIAN, 2019). Há controvérsias quanto ao uso do imiquimod, um modificador da resposta imune local, aplicado em creme, para tratar o melanoma *in situ*. Indicações mais seguras são aplicadas para os casos onde o uso do imiquimod é o tratamento adjuvante após a excisão com margens estreitamente claras ou positivas. A radioterapia pode ser considerada uma opção de tratamento de segunda linha para os casos em que a remoção cirúrgica completa não é possível (SCHADENDORF et al., 2018; QUINTANILLA-DIECK; BICHAKJIAN, 2019).

Para os melanomas considerados em estágio I, cujos tumores possuem espessura superior a 1 mm ou com ulcerações, além da cirurgia, faz-se necessária a pesquisa por linfonodo sentinela, isto é, para aquele gânglio linfático mais próximo da lesão. O procedimento cirúrgico envolve o alargamento das margens de segurança, chegando ao tecido celular subcutâneo, podendo variar de 0,5 até 2 cm para aqueles tumores com mais de 4 mm de espessura, levando em consideração também a localização da lesão (SCHADENDORF et al., 2015; HEISTEIN; ACHARYA, 2020). A avaliação do linfonodo sentinela por excisão objetiva saber se as células do melanoma migraram da lesão inicial. As indicações terapêuticas serão tomadas a partir dessa avaliação. Se o resultado for negativo, ou seja, não há células tumorais no linfonodo sentinela, considera-se o paciente livre de tumor, e esse paciente passa a ser observado a cada 6 a 12 meses por 5 anos e anualmente a partir de então. Se o resultado for positivo removem-se os demais linfonodos daquela região (linfadenectomia) e a aplicação de outras terapias adjuvantes dependerá do estado geral do paciente (SCHADENDORF et al., 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019b; QUINTANILLA-DIECK; BICHAKJIAN, 2019).

Pacientes em estágio II e III são submetidos aos mesmos procedimentos de alargamento de margem e pesquisa de linfonodo sentinela, bem como esvaziamento ganglionar. O tratamento adjuvante não é consensual e é discutido caso a caso (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019b).

O estágio IV, cerca de 10% dos casos de melanoma diagnosticados, dispõe atualmente de quimioterapia, cirurgia, radioterapia, imunoterapia e terapêutica alvo. Aproximadamente um

terço desses pacientes são diagnosticados com comprometimento visceral e cerebral o que se traduz em um prognóstico grave e menor chance de resposta ao tratamento (LEONARDI et al., 2018).

Como terapia adjuvante adicional podem ser aplicados imunoterapia utilizando inibidores PD-1: pembrolizumabe e nivolumabe; inibidor de CTLA-4: ipilimumab; interleucina 2 (IL2); tratamento com vírus oncolítico: *Talimogene laherparepvec* (T-VEC); Vacina Bacille Calmette-Guerin (BCG). Medicamentos aplicados conhecidos como terapia direcionada ou terapia alvo, tratam os melanomas com mutação no gene *BRAF* e seus relacionados como *MEK* e *C-KIT*, cujas proteínas por eles produzidas imprimem às células de melanoma alta capacidade proliferativa. Assim, fármacos inibidores de *BRAF* incluem o vemurafenibe, dabrafenibe e encorafenibe, ou inibidores da *MEK* que são trametinibe, cobimetinibe e binimetinibe. Para os melanomas com alterações no gene *C-KIT* os fármacos utilizados são imatinibe e o nilotinibe (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019b). No Brasil, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, o relatório de recomendação, protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas, elaborado pelo Ministério da Saúde, assessorado pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde – Conitec, recomendou a incorporação da classe anti-PD1 (nivolumabe e pembrolizumabe) para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Outras mutações genéticas como *NRAS*, *NF1*, *CDKN2A* e *PTEN*, ainda não foram incluídas na prática clínica padrão, mas se identificadas podem permitir que os pacientes se beneficiem das abordagens experimentais em ensaios clínicos (LEONARDI et al., 2018). Identificar mutações específicas pode ser a chave para direcionamentos apropriados, eficazes e representar oportunidades de tratamento para os pacientes de melanoma (ADERHOLD et al., 2020).

2.1.4 Biologia do melanoma - Fundamentos moleculares

O comportamento clínico agressivo, taxa de letalidade e resistência terapêutica justificam os esforços para compreender-se os fundamentos moleculares de iniciação e progressão do melanoma. Assim, busca-se determinar as melhores estratégias terapêuticas e preventivas, de modo a proporcionar qualidade de vida ao paciente.

Resultado de um processo desencadeado por fatores exógenos e endógenos, além de condições intrínsecas ao tumor e relacionadas ao sistema imunológico (DEPERALTA; BOLAND, 2015), os melanomas podem desenvolver-se em uma lesão precursora previamente existente ou em uma pele com aparência saudável (LEONARDI et al., 2018). Podem apresentar-se em regiões do paciente expostas à radiação ultravioleta ou não, portanto, cada tumor pode envolver diferentes vias de sinalização de mutações genéticas e estágio de transformação (SHAIN; BASTIAN, 2016).

As múltiplas mutações na linha germinativa dão origem aos caracteres de susceptibilidade ao melanoma hereditário como pele e olhos claros, e cabelo ruivo. Mutações nos genes *CDKN2A*, *CDK4*, *RBI*, *MC1R* e *MITF* são comuns em pacientes com histórico familiar de melanoma (DEPERALTA; BOLAND, 2015). Dentre essas mutações 35-40% são alterações no gene *CDKN2A* (inibidor de cinase 2A dependente de ciclina) que codifica duas proteínas supressoras de tumor distintas: p16^{INK4A} e p14^{ARF}. Quando há falhas nesse sistema ocorre um descontrole do ciclo celular, promovendo a transição G1-S, e uma perda de dois importantes reguladores da homeostase celular: RB1 (proteína associada a retinoblastoma) e *TP53* (supressor de tumor). Menos comum, mas também importante, mutações no gene *CDK4* (cinase dependente de ciclina 4) e *MITF* foram encontradas em famílias com melanoma (PDQ CANCER GENETICS EDITORIAL BOARD, 2002; SCHADENDORF et al., 2015).

As alterações somáticas mais comuns afetam genes relacionados às principais vias de sinalização que envolvem processos celulares de proliferação, em que mutações nos genes *drivers* *BRAF* correspondem a 50% dos casos, *NRAS* em 25% e *NFI* em 15% dos casos de melanomas (SCHADENDORF et al., 2018). Dentre os mutantes *BRAF*, 90% das vezes são localizadas no códon 600, para os melanomas cutâneos, cerca de 60% deles apresentam mutação oncogênica *BRAF*^{V600E} e *BRAF*^{V600K} (ADERHOLD et al., 2020).

2.2 A BUSCA POR MODELOS TRIDIMENSIONAIS DE CULTURA DE CÉLULAS

O caminho percorrido para o desenvolvimento de novos fármacos é longo e desgastante (SINHA; VOHORA, 2018). Portanto, é natural que se avaliem os custos envolvidos e as chances de sucesso de cada novo projeto. Os números mais recentemente publicados, envolvendo as etapas decorrentes desse processo de desenvolvimento, citam cifras que podem variar de US\$ 944 milhões a US\$ 2,8 bilhões, incluindo aí as falhas (WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020; SIMOENS; HUYS, 2021). Se estivermos tratando de fármacos anticâncer os

números podem superar essas marcas (SCHLANDER et al., 2021). Independente do modelo utilizado para precificação dos produtos finais ou de que classe de novos fármacos estamos tratando (JAYASUNDARA et al., 2019), o processo de desenvolvimento de medicamentos pode ser segregado em estágios de desenvolvimento pré-clínico e clínico (SINHA; VOHORA, 2018).

A fase de desenvolvimento pré-clínico busca avaliar aspectos da farmacodinâmica, farmacocinética e toxicologia em configurações *in vitro* e *in vivo*. As respostas obtidas nesta fase influenciarão fortemente a abordagem das próximas etapas. Portanto, há eminente necessidade de obter-se modelos experimentais e abordagens metodológicas que possam traduzir qualidade de respostas (BRANCATO et al., 2020). Na fase pré-clínica, busca-se chegar a modelos pré-clínicos que superem questões éticas (MAK; EVANIEW; GHERT, 2014), sendo os estudos *in vitro* representantes de um modo rápido, simples, controlado e mais barato que os modelos em animais (HONEK, 2017).

Os modelos pré-clínicos *in vitro* de cultivo celular em monocamada, chamadas culturas bidimensionais (2D), contribuíram para o conhecimento da biologia do câncer por décadas (BOUSSOMMIER-CALLEJA, 2020). As culturas em 2D permitiram avanços importantes na compreensão das vias moleculares, ajudaram a desvendar os mecanismos básicos das doenças e foram usadas na descoberta de biomarcadores (LANGHANS, 2021). Estima-se que ainda sejam utilizadas por conveniência como etapa que antecede aos estudos pré-clínicos *in vivo* (LV et al., 2017). Porém, não permitem observar as “reais” interações celulares, nem traduzem as interações das células com a matriz extracelular. Portanto, os resultados obtidos em 2D distanciam-se do observado *in vivo* (BRESLIN; O’DRISCOLL, 2013). Atualmente, esses modelos têm se confirmado como um contribuinte importante para as falhas no desenvolvimento de medicamentos antitumorais (FONG et al., 2016). Assim, o desenvolvimento de modelos de cultura celular 3D busca encontrar semelhanças fisiológicas com os modelos *in vivo* (FONTOURA et al., 2020) e seguem sendo um desafio para pesquisadores e empresas do ramo.

Nessa lacuna as culturas celulares tridimensionais esforçam-se para superar as limitações das culturas em monocamada tradicionalmente usadas no desenvolvimento de medicamentos. Os modelos 3D parecem favorecer características espaciais para a transferência de oxigênio, fatores de crescimento e metabólitos. Ainda, procuram estabelecer uma dinâmica de matriz extracelular que suporta condições necróticas, de hipóxia, comportamentos celulares

quiescentes e proliferativos, além de mediar sensibilidade e resistência do tumor (HAM et al., 2016; RIEDL et al., 2017). A **Tabela 1** evidencia algumas das diferenças encontradas nos modelos de cultura em monocamada, 2D, e os modelos tridimensionais no estudo do microambiente tumoral.

Tabela 1: Principais comparações entre 2D e 3D ao estudar as interações do microambiente tumoral

(Continua)

	2D	3D
Morfologia	As células têm sua morfologia e polarização alteradas. Seu formato passa a ser plano e alongado, pois as células só podem crescer e se expandir bidimensionalmente.	As células mantêm seu formato natural e crescem formando agregados multicamadas. Polarização de forma real conservada.
Exposição das células ao meio	Todas as células na cultura recebem a mesma quantidade de nutrientes e fatores de crescimento do meio na placa. Isso faz com que mais células estejam no mesmo estágio do ciclo celular.	Se necessário, os nutrientes podem ser divididos igualmente entre todas as células. As células centrais geralmente permanecem inativas, pois recebem menos oxigênio e fatores de crescimento do meio, o que pode se assemelhar a estrutura e comportamento celular tumoral <i>in vivo</i> .
Diferenciação, proliferação e junções celulares	A diferenciação celular é pobre, a proliferação é anormalmente rápida. As junções das células são menos comuns e representam com menos precisão as junções reais.	Células bem diferenciadas, proliferação dependente da técnica e tipo celular. As junções celulares são comuns e permitem a comunicação célula a célula, o que ocorre por meio de troca de íons, pequenas moléculas e correntes elétricas.
Perfil genético	Os genes e proteínas de adesão, proliferação e sobrevivência celular são modificados em comparação com <i>in vivo</i>	Melhor representação de fatores de crescimento, genes pró-angiogênicos e de moléculas de adesão
Sensibilidade a fármacos e apoptose	As células geralmente têm pouca resistência aos fármacos, gerando resultados falso-positivos. Os fármacos não são bem metabolizados e induzem facilmente a apoptose	As células geralmente têm mais resistência ao tratamento medicamentoso e a indução à apoptose, metabolizam melhor e representam mais precisamente os efeitos dos fármacos.
Resposta a estímulos	Como as células não podem experimentar o efeito da gravidade, uma vez que são incapazes de se expandir para a terceira dimensão, a resposta a estímulos mecânicos é imprecisa.	As células podem experimentar o efeito da gravidade, representando de forma mais precisa uma célula <i>in vivo</i> .
Uso e análise	Fácil replicação e interpretação.	Pode ser de difícil replicação e há dificuldades relacionadas à interpretação dos resultados.
Reprodutibilidade	Mas, apenas culturas de curto prazo.	Mais caro e mais demorados, especialmente com algumas técnicas. Porém, como diminuem as diferenças entre as respostas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , diminuem também a probabilidade de uso de modelos animais
Custo	Preços acessíveis	

Adaptado de HOARAU-VÉCHOT et al (2018); JENSEN; TENG (2020) e RODRIGUES et al (2021).

Os modelos 3D estão classicamente amparados em dois grandes grupos, sendo modelos que independem de ancoragem, em que a auto agregação de células em esferas forma a cultura 3D. E tecnologias baseadas em arcabouços de ancoragem (*scaffolds*) que podem ser de origem natural ou sintética. Há ainda sistemas híbridos microfabricados de cultura microfluídica (*microfluidics culture*) e os chamados órgãos sobre chip (*organ-on-a-chip*). Todos os modelos propostos exploram o controle espaço-tempo das interações célula-célula e célula-matriz para que se traduzam as condições fisiológicas mais próximas quanto possíveis do observado *in vivo* (FONG et al., 2016; FERREIRA; GASPAR; MANO, 2018).

As metodologias para a produção de esferoides flutuantes, que se valem da força gravitacional, estão baseadas na promoção da adesão célula-célula e na repulsão das células à superfície da cultura. Dentre essas metodologias há o método da gota suspensa, onde as células se agregam no fundo de uma gota conectada a um suporte sólido, onde cada gota dará origem a um esferoide. Outro modo é o método de crescimento de células em superfícies não aderentes, ou seja, a adesão das células às placas de cultivo é evitada. Isso ocorre revestindo essas placas com materiais como ágar ou poli-hidroxietilmetacrilato, ou adicionando metilcelulose ao meio de cultura. Essa técnica pode gerar múltiplos esferoides de tamanhos variados. Há ainda métodos que utilizam sistemas agitados, como frascos rotativos ou biorreatores, onde os esferoides são formados por agregação e colisão espontânea de células (STADLER et al., 2015; LANGHANS, 2018). Esferoides podem ser formados também utilizando microcarreadores (microesferas) em sistemas que combinam cultura agitada e sistemas microfluídicos (ABEILLE et al., 2014) ou utilizando nanopartículas no método de levitação magnética (HAISLER et al., 2013). O modelo proposto por Bourland, Fradette e Auger (2018) é um exemplo onde esferoides formados pela técnica da gota suspensa e tecido endotelial, produzido por automontagem foram combinados para se obter um modelo de melanoma cutâneo e reproduzir o microambiente *in vitro* (BOURLAND; FRADETTE; AUGER, 2018).

Modelos 3D que se valem de arcabouços de ancoragem (*scaffolds*) têm as células incorporadas na matriz que objetiva imitar a matriz extracelular. A composição do material, suas propriedades físicas e químicas, terão influência direta no comportamento celular de adesão, proliferação e migração (LANGHANS, 2018). Os polímeros de origem natural são biocompatíveis e menos tóxicos. Os mais comuns incluem colágeno, quitosana, glicosaminoglicanos (ácido hialurônico), fibroína, agarose, alginato, amido e celulose.

Polímeros sintéticos por sua vez são mais versáteis, reprodutíveis, mas não são biocompatíveis (LV et al., 2017).

A dinâmica do microambiente tumoral e sua relação com a matriz extracelular faz com que cada um desses materiais tenha vantagens e desvantagens de aplicação. Portanto, a escolha do material deve levar em conta o objetivo do estudo em que o modelo 3D será empregado (LANGHANS, 2018; RODRIGUES et al., 2018). Na **Tabela 2** foram sumarizadas algumas vantagens e desvantagens dos modelos 3D baseados em plataformas de ancoragem e aqueles desprovidos de *scaffolds*.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos modelos 3D.

Tipo de método	Vantagens	Desvantagens
Flutuação forçada	<ul style="list-style-type: none"> • Relativamente simples • Barato • Adequado para testes de alto rendimento • Os esferoides produzidos são facilmente acessíveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilidade no tamanho e forma da célula, se não como número de célula fixo/poço • O revestimento de placas DIY é relativamente trabalhoso
Gota suspensa	<ul style="list-style-type: none"> • Barato se usar placa padrão de 96 poços • Esferoides homogêneos adequados para testes de alto rendimento • Os esferoides produzidos são facilmente acessíveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Mais caro se usar placas especializadas • Trabalho intensivo se preparar as placas internamente • O pequeno volume de cultura dificulta a troca do meio, sem perturbar as células (manuseamento mais fácil proposto com formatos disponíveis comercialmente)
Abordagens baseadas em agitação	<ul style="list-style-type: none"> • Simples de cultivar células • Produção em larga escala relativamente fácil de alcançar • Movimento de cultura auxilia no transporte de nutrientes • Esferoides produzidos são facilmente acessíveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipamento especializado necessário • Sem controle sobre o número da célula/tamanho do esferoide (pode ser superado por etapa de cultura adicional) • Demora para HTS devido à etapa extra necessária para esferoides homogêneos • Células possivelmente expostas a força de cisalhamento em frascos giratórios (pode ser problemático para células sensíveis)
Matrizes e andaimes	<ul style="list-style-type: none"> • Fornece suporte 3D que imita <i>in vivo</i> • Alguns incorporam fatores de crescimento 	<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser caro para produção em larga escala • Pode ter dificuldade em recuperar células após a formação da cultura 3D
Plataformas de cultura de células microfluidica	<ul style="list-style-type: none"> • Descrito como adequado para testes de alto rendimento 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipamento especializado necessário somando despesas • Análise adicional de culturas 3D produzidas pode ser difícil

Adaptado de BRESLIN; O'DRISCOLL (2013).

Especificamente no estudo do melanoma, desde que as primeiras células tumorais foram utilizadas (SHOEMAKER, 2006), várias foram as propostas para estudo *in vitro*. Hölken & Teuschou (2021) propuseram uma organização temporal para demonstrar as abordagens

realizadas no estudo dessa doença e seu microambiente, *in vitro*, ao longo de mais de meio século (**Tabela 3**).

Tabela 3: Marcos selecionados no desenvolvimento de modelos de melanoma cutâneo 3D *in vitro*.

(Continua)

Ano	Marco	Tipos de células
1967	Estabelecimento das primeiras linhagens celulares de melanoma humano (monocamada) em cultura de células	Linhagens celulares de melanoma derivadas de pacientes (LeCa 19.4, LeCa 26.5, MeGo)
1973	Desenvolvimento do primeiro esferoide de melanoma 3D (células murinas).	Células de melanoma murino B-16
1973	Estabelecimento das primeiras linhagens celulares de melanoma humano em cultura de células em suspensão.	Linhagens celulares de melanoma derivadas de pacientes (A-375, A-875)
1975	Estabelecimento de cultura de células de queratinócitos humanos	Queratinócitos humanos primários co-cultivados com células 3T3 irradiadas letais
1981	Desenvolvimento do primeiro modelo de pele de espessura total <i>in vitro</i> (células de rato)	Fibroblastos primários de rato co-cultivados com células epidérmicas (rato)
1984	Desenvolvimento dos primeiros esferoides de melanoma humano (cultivados diretamente do material do paciente)	Células de melanoma derivadas do paciente
2000	Desenvolvimento de um modelo de melanoma 3D humano de espessura total. Mostra os diferentes comportamentos celulares, de acordo com o microambiente a que são expostas. Como se comportam melanócitos e células de melanoma quando cultivados sob influência de queratinócitos e fibroblastos.	Queratinócitos humanos primários, fibroblastos, linhagem celular de melanoma metastático (HBL)
2000	Desenvolvimento de um modelo de melanoma 3D humano de espessura total com células de melanoma de RGP, VGP ou linhagens celulares de melanoma metastático para estudar metástase de melanoma precoce.	Queratinócitos humanos primários, linhagens celulares de melanoma de RGP (PM-WK), VGP (RPM-EP) ou linhagens celulares metastáticas (MM-AN, MM-RU). Sem fibroblastos
2000	Desenvolvimento do primeiro modelo 3D de melanoma humano completamente baseado em células. Analisam os padrões de crescimento de células de melanoma representando diferentes estágios de progressão tumoral.	Queratinócitos humanos primários, fibroblastos, linhagens celulares de melanoma de RGP (progressão radial) (WM35), VGP (progressão vertical) (WM793), linhagem de melanoma metastático (WM852)
2005	Isolamento de populações de células-tronco multipotentes da subpopulação de esferoides de linhagens celulares de melanoma estabelecidas	Linhagem celular estabelecida de melanoma primário humano (WM115) e linhagem celular de melanoma metastático (WM239A)
2013	Desenvolvimento de um modelo 3D de melanoma humano microvascularizado completamente baseado em células: a integração de uma linhagem celular de melanoma metastático induziu efeito pró-angiogênico nas células endoteliais e levou a uma rede microvascular mais ramificada.	Queratinócitos e fibroblastos humanos primários, células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), linhagens celulares de melanoma primário (A375, SK MEL 28), células de melanoma metastático (Malme3, RPMI7951)
2013	Desenvolvimento de um modelo esferoide de melanoma cutâneo humano em 3D completamente baseado em células	Fibroblastos humanos primários, queratinócitos e esferoides tumorais (linhagens celulares de melanoma humano SBCL2 (RGP), WM-115 (VGP) e 451-LU (MM)

Tabela 3: Marcos selecionados no desenvolvimento de modelos de melanoma cutâneo 3D *in vitro*.

(Conclusão)

Ano	Marco	Tipos de células
2015	Desenvolvimento de um modelo 3D humano de invasão de melanoma com fibroblastos humanos estimulados a produzir seus próprios constituintes da MEC (colágeno III, IV e VII)	Fibroblastos humanos primários, queratinócitos, linhagem celular de melanoma humano primário (WM35) ou linhagem celular de melanoma metastático (SK-MEL-28)
2016	Desenvolvimento de um modelo de melanoma 3D humano ferido e inflamado para investigar o uso de um anti-inflamatório na invasão do melanoma	Fibroblastos humanos primários, queratinócitos, linhagens celulares de melanoma metastático (HBL, A375-SM, C8161)
2017	Desenvolvimento de um modelo de melanoma 3D humano para estudar a invasão de melanoma ao longo do tempo e profundidade de invasão	Fibroblastos humanos primários, queratinócitos e linhagem celular de melanoma de RGP precoce (WM35) ou células de melanoma metastático (SK-MEL-28)
2018	Desenvolvimento do primeiro modelo de melanoma 3D com capilares sanguíneos e linfáticos	Fibroblastos humanos, queratinócitos, células endoteliais microvasculares humanas (HMVEC), esféricas de melanoma (A375, Malme 3 M, SK-MEL 28, RPMI 7951, WM983A ou WM983B)
2019	Construção de um organoide 3D de linfonodo/melanoma imunorreforçado a partir do próprio tumor do paciente (pode permitir estudos para imunoterapia personalizada)	O tecido do linfonodo + melanoma do paciente foi triturado e digerido para obter as células. Todas as células (não classificadas) foram semeadas em hidrogel à base de colágeno imitando ECM
2019	Desenvolvimento de um modelo de melanoma 3D aprimorado pelo sistema imunológico humano para estudar o microambiente jovem versus envelhecido em melanoma	Queratinócitos humanos, fibroblastos jovens e envelhecidos, linhagens celulares de melanoma (1205lu, WM3918), células T

Adaptado de HÖLKEN; TEUSCH (2021).

Ao longo do tempo é possível perceber o avanço tecnológico e, mesmo dispondo de recursos analíticos limitados nos anos iniciais, há preocupações relevantes com relação aos cuidados necessários à prática do cultivo celular, como a possibilidade de contaminações cruzadas e a necessidade da correta identificação dos tecidos. Os modelos apresentados vão desde o cultivo em 2D, até modelos livres de ancoragem e os que se valem de *scaffolds*. Do mesmo modo, estão presentes observações para as quais ainda se buscam respostas. Uma dessas perguntas advém das descobertas sobre a importância do microambiente na origem e progressão do tumor.

Atualmente, sabe-se que o microambiente é composto não apenas por células tumorais, mas também por fibroblastos, células endoteliais, células imunes, moléculas solúveis e a matriz extracelular (MEC). A resultante da interação das células tumorais com as células circundantes e os demais componentes do microambiente tumoral pode ser um ambiente de suporte ou supressor do tumor (VILLANUEVA; HERLYN, 2008; BEJARANO; JORDÃO; JOYCE, 2021). Os principais desafios nas plataformas de melanoma incluem capturar os processos da

doença, dentre eles a metástase, a resistência e a resposta imune do tumor, bem como o impacto do envelhecimento e exposições ambientais. Os modelos mais atuais para o estudo do melanoma *in vitro* incluem reconstruções de pele, explantes de tecidos e esferoides tridimensionais (PATTON et al., 2021), sendo que cada sistema de cultura de células 3D tem seus próprios pontos fortes e fracos em relação ao crescimento tumoral *in vivo* e ao microambiente tumoral (LANGHANS, 2021).

O cenário atual ainda não dispõe de um modelo 3D ideal que imite todas as características do microambiente fisiológico ou fisiopatológico específico para doenças de tecido *in vivo*, mas o ritmo acelerado das pesquisas faz acreditar que isso esteja próximo.

2.2.1 A Nanocelulose Bacteriana (BNC)

No universo de opções de materiais utilizados para a construção de *scaffolds* para cultivo celular 3D, temos a celulose bacteriana.

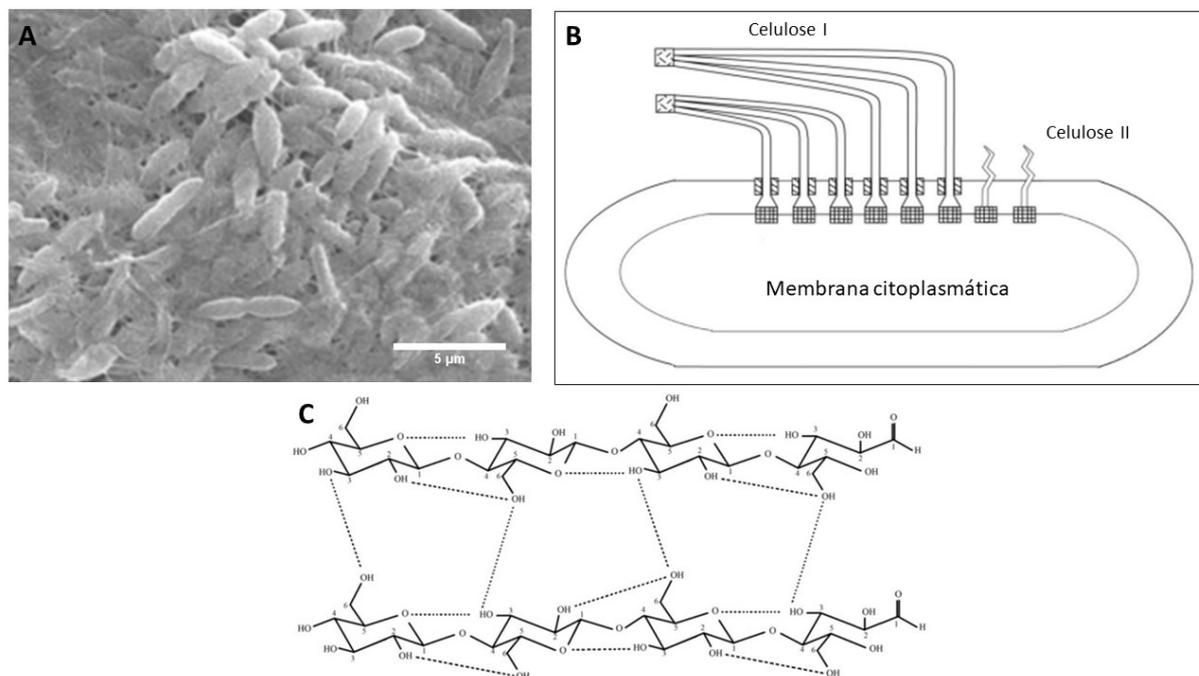
A celulose bacteriana (BC) é um polímero de origem natural, cujas propriedades e composição química despertou o interesse dos pesquisadores quanto a aplicação na engenharia de tecidos. Descrita por Brown (1886) como “planta do vinagre”, atualmente sabe-se que, além das plantas, também as bactérias, fungos e algas são capazes de produzir celulose. Dentre as bactérias acéticas Gram negativas em forma de bastonetes, as mais promissoras são as do gênero *Gluconacetobacter* (sinônimo *Komagataeibacter*) (TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019; R et al., 2021). Com conhecidas características descritas na escala nanométrica (KLEMM et al., 2005), a celulose bacteriana pode ser chamada de nanocelulose bacteriana (BNC).

O processo de biossíntese da nanocelulose bacteriana ocorre na interface do meio de cultura ar-líquido (R et al., 2021), quando as bactérias (**Figura 2A**) cujos terminais celulares citoplasmáticos contendo celulose sintase (**Figura 2B**) polimerizam resíduos de D-glicose em cadeias lineares de β -1,4-glucano (ligações β -glicosídicas) e secretam extracelularmente as cadeias formadas (**Figura 2C**). A síntese consiste em um processo complexo de três etapas principais sendo: a) polimerização dos resíduos de glicose em cadeias β 1- 4-glucano; b) secreção extracelular das cadeias lineares; c) organização e cristalização das cadeias de glucanas através de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas hierarquicamente em paralelo ou aleatoriamente, conforme o processo de fermentação

empregado. Dessas etapas resulta uma estrutura tridimensional resistente chamadas microfibrilas e feixes de microfibras ou microfibras (CHAWLA et al., 2009; ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; KLEMM et al., 2018; SHARMA; BHARDWAJ, 2019; YUEN et al., 2019). No entanto, o mecanismo de polimerização da glicose por essas bactérias em cadeias não ramificadas e longas não é totalmente compreendido (MOHITE; PATIL, 2014; R et al., 2021).

As excelentes propriedades químicas e mecânicas da BNC, pureza, moldabilidade e biocompatibilidade, encontram aplicação de diversos segmentos como alimentos, cosméticos, farmacêuticos, eletro e eletrônicos, sistemas de purificação de água e no segmento biomédico (CHAWLA et al., 2009; ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; BRANDES et al., 2018; KLEMM et al., 2018; SHARMA; BHARDWAJ, 2019; YUEN et al., 2019).

Figura 2: Estrutura de bastonete da bactéria produtora de BNC, representação esquemática da excreção de BNC pela bactéria e estrutura química da BNC.



Legenda: A) Bactérias *Komagataeibacter hansenii*, ATCC 23769, aderidas na camada superficial de uma esfera de celulose, adaptado de BRANDES et al. (2018). B) Produção de nanofibras de celulose por bactérias do gênero *Komagataeibacter*, adaptado de CHAWLA et al (2009). C) Estrutura química da nanocelulose bacteriana, mostrando as ligações de hidrogênio inter e intra moleculares, adaptado de ESA; TASIRIN; RAHMAN (2014).

Se em 2016 o mercado global de BNC estava avaliado em 207,36 milhões de dólares com previsão para 497,76 milhões de dólares ao final de 2022 (SHARMA; BHARDWAJ,

2019), atualmente a previsão de crescimento superam os US\$ 3 bilhões para 2026 (DataIntel, 2020). No início dos anos 2000, apenas na plataforma *Web of Science*, foram localizadas cerca de 90 publicações sobre nanocelulose bacteriana, enquanto ao final de 2018, as publicações relativas ao tema, estavam próximas de 1000 (PANG et al., 2020).

Em aplicações de engenharia de tecidos ou engenharia tecidual, a estrutura nanofibrosa hierárquica da BNC assemelha-se à matriz extracelular e permite o crescimento celular em modelos tridimensionais (3D). A BNC tem estrutura capaz de reter 99% de água, possui túneis, poros únicos e distintos que interferem na adesão e proliferação celular (HALIB et al., 2019). A síntese da BNC ocorre na interface ar-líquido, assim, as mais variadas formas podem ser alcançadas, valendo-se ou não de moldes. Os meios de cultivo podem ser incubados estaticamente (BERTI et al., 2013; DE SOUZA et al., 2019) ou submetidos a processos agitados (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; BI et al., 2014).

Quando a BNC é empregada em sistema de cultura de células, devido à composição pura, é possível superar problemas de reprodutibilidade de resultados, oriundos de outros *scaffolds*, cujos fatores de crescimento residuais ou substâncias indefinidas presentes na sua composição, sofrem com variações lote a lote (RODRIGUES et al., 2018).

A BNC pura (HOSHI et al., 2018; OSORIO et al., 2019a) ou conjugada a outras moléculas e materiais, já mostrou sua importância e relevância (BACAKOVA et al., 2019). Dentre as diversas aplicações para cultivo celular podemos citar modelos que envolvem sistemas membranares (VADAYE KHEIRY et al., 2018; OSORIO et al., 2019b; SIMEONI et al., 2021), esféricos (HU; CATCHMARK; VOGLER, 2013; YU et al., 2016; LAROMAINE et al., 2018), na forma de vasos sanguíneos (OSORIO et al., 2020) e outras estruturas tubulares (CORZO SALINAS et al., 2021). A BNC foi empregada na busca por um biomaterial promissor para tecido ósseo (VIELREICHER et al., 2018) e para engenharia de tecidos complexos cujas células são alinhadas (PRATHAPAN et al., 2020).

O uso da BNC como plataforma para cultura de células tumorais é demonstrado por diversos autores (WANG et al., 2018; UL-ISLAM et al., 2019; UGRIN et al., 2021). Dentre as abordagens desenvolvidas, observa-se o uso frequente do modelo de membranas para a semeadura de células, assim como o emprego de celulose bacteriana pura ou modificada (química ou fisicamente). Essas pesquisas buscam conhecer os efeitos da fibra do polímero sobre o comportamento celular. Características das fibras consideradas relevantes são o tamanho, a distribuição e a organização espacial. Do mesmo modo, são estudados os impactos

da presença, distribuição e tamanho de poros nas plataformas, uma vez que servem de ancoragem para as células utilizadas.

Envolvendo células tumorais são encontrados estudos com a aplicação de linhagem de células de câncer de mama humano (MDA-MD-231) semeada em plataforma de BNC macroporosa (XIONG et al., 2014) ou em BNC combinada com gelatina, mostrando seu potencial positivo em cultura 3D *in vitro* (WANG et al., 2018). Nanofibras de celulose bacteriana e acetato de celulose eletrofiada foram utilizadas para imitar a estrutura fibrilar da MEC natural do câncer de mama, utilizando a linhagem celular MCF-7, demonstrando bom desempenho para estudos de progressão do tumor e triagem de fármacos (LUO et al., 2019).

Ainda, *scaffolds* nanofibrosos de nanocristais de celulose bacteriana contendo policaprolactona e gelatina foram fabricados com sucesso por eletrofiação para mimetizar a matriz extracelular do glioblastoma, o tipo de tumor cerebral mais comum e extremamente letal. A plataforma promoveu o crescimento e alongamento do axônio, apoiando a comunicação entre as células tumorais e o microambiente, desencadeando o processo de recorrência do tumor (UNAL et al., 2020). Utilizando a combinação com ácido hialurônico, gelatina, BNC também recebeu com sucesso células de glioblastoma (U251) para criar a plataforma 3D de cultivo celular (UNAL et al., 2021).

Plataformas membranares de BNC, após a imobilização química do peptídeo IKVAV, foram utilizadas para estudos de angiogênese uma vez que induziram as células melanoma humano (SK-MEL-28) a se organizarem como redes bem estabelecidas relacionadas ao processo de mimetismo vasculogênico. A conclusão dos autores, porém, é que tanto a BNC pura quanto a BNC modificada possuem potencial para serem usados como uma plataforma tridimensional que permite a triagem de fármacos antitumorais (REIS et al., 2018).

O presente trabalho pretende submeter células de melanoma humano (SK-MEL-28) com perfil agressivo de proliferação e invasão (REBECCA; SOMASUNDARAM; HERLYN, 2020) a um estruturado, porém, delimitado espaço de matriz para cultivo celular (plataforma de BNC). O estudo desse delimitado microambiente tumoral pode auxiliar a compreender os mecanismos de interação célula-célula e célula-matriz. O reconhecimento dessas informações poderá suscitar o desenvolvimento de um novo modelo 3D, cujas aplicações podem contribuir na descoberta de novos biomarcadores, na compreensão de novas rotas metabólicas de progressão do tumor, ou na triagem de novos fármacos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma plataforma estruturada esférica baseada em nanocelulose bacteriana, com espaço tridimensional delimitado para o cultivo de células *in vitro* que permita avaliar a interação célula-célula e célula-matriz em estudos do microambiente tumoral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer e padronizar o método de produção das plataformas 3D de nanocelulose sintetizada por *Komagataeibacter hansenii*.
- Caracterizar a microestrutura e a composição físico-química das plataformas esféricas de nanocelulose obtidas.
- Estabelecer os parâmetros de cultura das células SK-MEL-28 (quantidade de células/tempo de cultivo) através do perfil de distribuição volumétrica destas células na microestrutura 3D das plataformas de nanocelulose.
- Compreender o perfil de crescimento (atividade metabólica) das células de melanoma humano SK-MEL-28 nas matrizes 3D desenvolvidas.
- Caracterizar o comportamento de adesão e interação das células SK-MEL-28 quando cultivadas na microestrutura 3D desenvolvida.
- Verificar a expressão gênica de adesão e proliferação das células cultivadas nas plataformas esféricas de BNC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A cepa *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, adquirida da “Coleção de Cultura Tropical (CCT)” (Fundação André Tosello, Brasil), foi utilizada para a produção de esferas e membranas de BNC. Alíquotas seguem sendo mantidas no ultra congelador a -80°C (Glacier Ultralow Temperature Freezer) disponível no LiEB/UFSC até necessidade.

Demais reagentes comercialmente disponíveis: fosfato de sódio dibásico (Neon), fosfato de potássico monobásico (Neon), sulfato de magnésio heptahidratado (Neon), cloreto de cálcio dihidratado (Nuclear), hidróxido de sódio (Vetec), cloreto de amônio (Vetec), glicose (Sigma Aldrich), manitol (Sigma Aldrich), extrato de levedura (Sigma Aldrich), peptona (Sigma Aldrich) e ágar (Sigma Aldrich) foram utilizados como componentes dos meios de reativação de cepa e cultura de bactérias.

Células de melanoma humano imortalizadas SK-MEL-28 para cultura celular *in vitro* foram cultivadas em meio de cultura contendo carbonato de sódio (Sigma Aldrich), penicilina-estreptomicina (pen/strep), meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), soro fetal bovino (FBS). A enzima TrypLE Express® (Gibco), solução salina tamponada com fosfato diluída para 1x (PBS 10X, pH 7,4 Gibco), CellTiter 96® Aqueous One Solution (MTS) (Promega Biotecnologia do Brasil), formaldeído e glutaraldeído também foram utilizados em vários ensaios. DAPI [(4',6-diamidino-2-fenilindol, sal dicloridrato) Molecular Probes Inc.], Alexa Fluor 546 conjugados com faloidina (Molecular Probes Inc.), Triton® X100 (Sigma Aldrich) e Prolong® Gold (Molecular Probes Inc.) foram utilizados para as análises de microscopia confocal.

Para as análises de expressão gênica foram utilizados TRIzol® Reagent (Invitrogen), seguido do kit comercial GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega).

4.2 PRODUÇÃO DAS PLATAFORMAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA

4.2.1 Reativação da cepa *Komagataeibacter hansenii*

Para reativar a cepa de *K. hansenii* ATCC 23769, uma alíquota foi descongelada e cultivada no meio manitol. Este meio manitol era composto de 25 g/L de manitol, 5g/L de extrato de levedura e 3 g/L de peptona. Após a mistura dos componentes, o pH foi ajustado para 6,5 (Hanna, modelo pH21) e o meio foi submetido à autoclavação por 20 min, a 121°C e 110 kPa. A cepa foi mantida em incubadora bacteriológica (BOD Nova Ética) a 26 °C por 7 dias. Após a etapa de reativação, foram testadas duas rotas para produção de inóculo.

4.2.2 Rota A para produção do inóculo I

Foram produzidas inicialmente placas de manutenção, transferindo 100 µL do meio de reativação da cepa para placas de Petri contendo ágar manitol, previamente esterilizado. O ágar manitol era composto por 25 g/L de manitol, 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona e 15 g/L de ágar em pH ajustado para 6,5. As placas de manutenção foram incubadas em estufa bacteriológica BOD (Nova Ética) a 26 °C por 7 dias. A partir das placas de manutenção foram produzidas placas de trabalho, que foram também incubadas a 26 °C por 7 dias.

A partir das placas de trabalho, produziu-se o inóculo I. Desse modo, todo o crescimento bacteriano resultante foi transferido para frasco cônico contendo 40 mL de meio mínimo de cultura. O meio mínimo de cultura era composto por 4,64 g/L de fosfato de sódico dibásico; 2,4 g/L de fosfato de potássico monobásico; 0,19 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado; 0,03 g/L de cloreto de cálcio di-hidratado; 0,40 g/L de cloreto de amônio e 4,5 g/L de glicose. O pH foi ajustado para 6,5 com solução 100 mM de hidróxido de sódio antes da esterilização. A composição do meio mínimo de cultura bacteriano foi adaptada de De Souza e colaboradores (2019), removendo daquela composição o cloreto de sódio e simplificando a metodologia de produção. Esse frasco contendo o conteúdo bacteriano em meio mínimo foi submetido a agitação (Agitador Phoenix-Luferco AP56) na sua velocidade máxima por 1 min. Após 2 min de repouso, aguardando a sedimentação do lisado bacteriano, foi realizada leitura da densidade óptica ($OD = 1 - 1,3$) do sobrenadante em espectrofotômetro (Thermoplate, $\lambda = 630$ nm). Com auxílio de pipeta, 30 mL do sobrenadante foi transferido para frasco reagente graduado, contendo 270 mL de meio mínimo de cultura. Esse frasco reagente foi incubado em BOD a 26 °C por 5 dias e denominado inóculo I.

4.2.3 Rota B para produção do inóculo II

Após o período de incubação de 7 dias, destinado à etapa de reativação, ao frasco reagente, contendo da cepa reativada, adicionou-se 300 mL de meio manitol, cuja composição está descrita acima. O frasco foi mantido em BOD a 26 °C por mais 7 dias. Passado este período de incubação, o conteúdo desse frasco reagente foi denominado inóculo II.

Todas as manipulações foram feitas estritamente em cabine de segurança biológica (Valiclean - Modelo: Classe II A1), a fim de garantir a esterilidade das amostras.

4.2.4 Produção das esferas de nanocelulose bacteriana sob fermentação dinâmica

As esferas de nanocelulose bacteriana (BNC-TS) foram sintetizadas por *K. hansenii*, cultivadas em meio mínimo de cultura. Dados como diâmetro das esferas obtidas, número de esferas por frasco, aspecto e pH final do meio de cultura foram considerados parâmetros para decidir a melhor rota para síntese das plataformas esféricas.

Inicialmente, para que fossem estabelecidas as condições de fermentação dinâmica, apenas o inóculo I foi utilizado para a síntese das esferas. Assim, foram variados os volumes de inóculo empregado em cada experimento, bem como a velocidade de agitação. Os experimentos utilizaram volumes de 5%, 10% e 15% (v/v) do inóculo I, que foram adicionados ao meio mínimo de cultura e transferidos para os frascos de Erlenmeyer de 125 mL. Esses frascos foram mantidos sob agitação de 1,33; 1,7 e 2,0 Hz a 26 °C por 5 dias.

Os experimentos que utilizaram o inóculo II empregaram apenas o volume de 10% (v/v) em meio mínimo de cultura, que foram transferidos para os frascos de Erlenmeyer de 125 mL e mantidos sob agitação de 1,7 Hz a 26 °C por 3 dias.

Todas as experiências foram conduzidas em um agitador rotativo (Nova Ética Modelo 430 / RDBP, Brasil). As BNC-TS obtidas foram purificadas por imersão completa em solução de 0,1 M de hidróxido de sódio por 24 h a 50 °C. As BNC-TS foram lavadas com água destilada até o pH atingir 7,4. Em seguida, BNC-TS foram autoclavadas por 20 min, a 121 °C e 110 kPa; e mantidas esterilizadas sob refrigeração a 4 °C até serem utilizadas na cultura de células e demais caracterizações.

4.2.5 Produção das membranas de nanocelulose bacteriana sob condições estáticas

Membranas de nanocelulose bacteriana foram sintetizadas por *K. hansenii*, cultivadas em meio mínimo sob condições estáticas, utilizando placas de cultura (Kasvi) de 24 poços (1,53 cm de diâmetro). Assim, cada poço recebeu o volume de 480 µL sendo 10% (v/v) do inóculo II em meio mínimo, e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica (BOD, Nova Ética) a 26 °C por 7 dias. As membranas obtidas na interface líquido/ar de cada poço foram purificadas por imersão completa em solução de 0,1 M de hidróxido de sódio por 24 h a 50 °C e lavadas com água destilada até o pH atingir 7,4. Em seguida, as membranas foram autoclavadas por 20 min, a 121 °C e 110 kPa, e mantidas esterilizadas sob refrigeração a 4 °C para serem utilizadas na cultura de células.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE ESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura das BNC-TS foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JSM 6390LV, JEOL) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). As imagens da microestrutura das amostras e redes de nanofibras foram capturadas com uma aceleração de 10 kV, usando diferentes ampliações.

Antes das análises, as amostras foram secas por um secador de ponto crítico (BERTI, 2012) nas dependências do Laboratório de Materiais Elétricos (LAMATE/UFSC) e logo após armazenadas em dessecador de vidro até serem submetidas às etapas de preparação para a microscopia. No LCME, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido por 3 min e rapidamente submetidas à secção por lâminas de corte. Logo após, as secções obtidas foram fixadas sobre fitas de carbono aderidas a suportes de alumínio (*stubs*) para posteriormente serem pintadas com ouro usando um equipamento metalizador (EM SCD500, Leica). O diâmetro das fibras e a porosidade alcançada no arranjo das estruturas foram avaliados através da análise das imagens de MEV pelo software ImageJ® (versão 1.51k) disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

4.3.2 Espectrofotometria por Infravermelho por Transformada de Fourier ou análise por FTIR

As BNC-TS foram previamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h em ultra congelador vertical (Glacier Ultralow Temperature Freezer) e logo após liofilizadas (Liotop L101) por 48 h nas dependências do Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB/UFSC) e armazenadas em dessecador até que fossem analisadas.

As amostras foram analisadas por espectrofotômetro, infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscópico (modelo Cary série 600, Agilent) e os espectros foram verificados na faixa de comprimento de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acumulação de 32 varreduras no modo de refletância total atenuada (ATR) com célula de seleneto de zinco.

4.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas das esferas de BNC secas por liofilização foram registradas (STA 449 F3 Jupiter). As amostras (10 mg) foram aquecidas em recipientes abertos de α -alumina de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob uma atmosfera de nitrogênio (taxa de fluxo: 60 mL/min) a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$.

4.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*- DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada em um Jade-DSC (Perkin Elmer) equipado com o sistema intracooler 2P. As amostras (10 mg) foram dispostas em cadinhos fechados de alumínio, equilibradas por 1,0 min a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, após o aumento da temperatura para $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, a isoterma foi mantida por 1 min e a amostra foi resfriada a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ na mesma taxa. A taxa de fluxo de nitrogênio foi de $20,0\text{ mL/min}$.

4.4 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO CELULAR NAS PLATAFORMAS DE BNC

4.4.1 Cultura celular e semeadura celular nas esferas e membranas de BNC

Células de melanoma humano imortalizadas SK-MEL-28 (P22) foram cultivadas em meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram mantidas em uma incubadora com 5% de CO_2 (Ultrasafe HF 212UV, Brasil) a 37°C e 95% de ar

umidificado durante os testes *in vitro*. O meio de cultura celular foi trocado a cada 2-3 dias até que as células atingissem 80 – 90% de confluência. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e adicionado 1 mL de uma solução de TrypLE Express®. As placas de cultura de tecido foram mantidas em estufa de CO₂ por 5 min para a ativação da tripsina e descolamento das células aderidas na placa de cultura. As células foram então transferidas para tubos cônicos de plástico de 15 mL e centrifugadas por 3 min a 5000 rpm. A solução sobrenadante foi removida e as células foram ressuspensas em meio de cultura para quantificação em câmara de Neubauer (SP Labor, Brasil). Com essa suspensão celular, foram realizadas séries de experimentos com diferentes densidades celulares sendo cultivadas dentro das esferas (BNC-TS) e sobre membranas de BNC, ambas plataformas previamente esterilizadas e ambientadas por 24-48 h em meio DMEM. Essas células foram empregadas nos seguintes experimentos:

- a) Inicialmente foram utilizados dessa suspensão 100 µL, contendo o equivalente a 5×10^5 células SK-MEL-28, que foram injetadas na região central de cada amostra de BNC-TS (BNC-TS-C com compartimentação interna múltipla e BNC-TS-H com um único espaço interno limitado) com 7 a 8 mm de diâmetro. Essas BNC-TS, contendo as células SK-MEL-28, foram incubadas por 4, 8, 12 e 72 h a 37 °C e 5% de CO₂ submersas em meio DMEM em placas de 6 poços.
- b) Em uma segunda série de testes foram utilizados 100 µL, porém contendo 10^6 células SK-MEL-28, que foram injetados na região central das BNC-TS-C com tamanhos entre 7 e 8 mm de diâmetro. Essas esferas foram incubadas submersas em meio DMEM, em placas de 24 poços, por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias a 37 °C e 5% de CO₂. Cada poço da placa de cultivo recebeu 1,5 mL de DMEM que foi trocado a cada 2 – 3 dias.
- c) Nessa mesma segunda série de testes, membranas de BNC foram acondicionadas em placas de cultivo celular 24 poços, sempre com a superfície tecidual esponjosa (BERTI, 2012) da membrana voltada para cima, conhecida por ter uma menor densidade de nanofibras (BÄCKDAHL et al., 2006). Cada membrana recebeu 30 µL da suspensão celular, contendo 10^6 células SK-MEL-28. Essas membranas foram incubadas submersas em 500 µL de meio de cultura DMEM e cultivadas por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias a 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias.

- d) Para o desenvolvimento do método de extração de RNA das células SK-MEL-28 cultivadas nas plataformas esféricas, foram utilizadas BNC-TS com 6 mm de diâmetro que receberam em seu interior 30 μL de suspensão celular, contendo 10^6 células/amostra. Essas BNC-TS foram incubadas em placas de 24 poços, cobertas por 1,5 mL de meio de cultura DMEM por 24 h. Transcorrido esse período, as esferas de BNC foram lavadas com PBS duas vezes e transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL onde receberam 500 μL de tiocianato de guanidina e fenol em uma solução monofásica (TRIzol[®] Reagent) e foram mantidas em $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até etapa de extração do RNA.
- e) Em etapa seguinte, para os ensaios de expressão gênica, novas amostras de BNC-TS-C (7-8 mm diâmetro) receberam em seu interior 100 μL de suspensão celular, contendo o equivalente a 10^6 células/amostra e foram incubadas por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias em meio DMEM (trocado a cada 2 – 3 dias). Decorrido cada período, as amostras correspondentes foram lavadas duas vezes com PBS e transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL, contendo 500 μL de TRIzol[®] Reagent cada. Os ensaios foram realizados em triplicada biológica e as amostras mantidas sob refrigeração a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até seu processamento. Em paralelo, foram cultivadas 5×10^5 células SK-MEL-28 em monocamada usando placas de petri (90 mm de diâmetro), por 3 dias (80-90% de confluência). Decorrido esse período as células passaram pelo processo de tripsinização, contagem e ressuspensão em meio de cultivo DMEM. Aliquotas dessa suspensão, contendo 10^6 células foram transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL, contendo 500 μL de TRIzol[®] Reagent. As amostras foram mantidas sob refrigeração a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até seu processamento.

4.4.2 Análise de atividade metabólica – Ensaios MTS

A atividade metabólica das células SK-MEL-28, cultivadas em esferas e membranas de BNC, foi determinada pela atividade mitocondrial das células através de MTS [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4- sulfofenil) -2H-tetrazólio] colorimétrico. O método baseia-se na capacidade de biorredução do composto MTS e formação do produto (formazan) solúvel em meio de cultura pelas enzimas mitocondriais de células viáveis. A mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade metabólica celular e pode ser medida em termos de absorbância.

Portanto, as células SK-MEL-28 que foram cultivadas durante 4, 8, 12 e 72 h a 37°C e 5% de CO₂, assim como as células que foram cultivadas por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias em BNC-TS foram avaliadas. Assim como células SK-MEL-28 que foram cultivadas sobre membranas de BNC (24 poços) e acompanharam o período de cultivo de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Após cada período de cultivo, o meio de cultura foi removido, as amostras esféricas ou membranares foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS e transferidas para uma nova placa de cultura. Em seguida, foi adicionado 300 µL de meio de cultura (DMEM) e 60 µL de reagente MTS a cada amostra que foi mantida por 2 h em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C. Após a incubação, cada amostra foi homogeneizada e 100 µL da solução sobrenadante foi transferida para uma nova placa de 96 poços para leitura da absorbância. Para cada ensaio foram utilizados como controle (branco) do experimento, BNC-TS ou membranas sem células, submetidas às mesmas condições de incubação e tratamento para ensaio MTS. A densidade óptica foi medida por espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 490 nm.

4.4.3 Adesão e morfologia de SK-MEL-28 cultivadas em esferas e membranas de BNC

A capacidade de adesão e a morfologia das células SK-MEL-28 cultivadas em esferas de BNC foram analisadas. Amostras que receberam 5×10^5 células e foram incubadas por 12 e 72 h, bem como amostras que receberam 10^6 células, após incubação por 1, 7, 14 e 21 dias foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JSM 6390LV, JEOL) operada a 10 kV e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM, modelo DMI6000 B, Leica).

Para MEV as amostras foram previamente fixadas em glutaraldeído a 2,5%, lavadas com 3 vezes com PBS e depois submetidas ao processo de desidratação com séries de soluções de etanol (20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% (v/v)). Finalmente, as amostras foram distribuídas nas redes de secagem da câmara Balzer, para serem secas por ponto crítico, do equipamento de secagem onde foi realizada a troca de solventes (etanol/CO₂ líquido) nas dependências do LAMATE/UFSC. Logo após, as amostras secas foram acondicionadas em dessecador de vidro e transportadas até o LCME/UFSC onde foram preparadas para MEV. As amostras secas foram imersas em nitrogênio líquido por 3 min, rapidamente submetidas à secção por lâminas de corte e fixadas sobre fitas de carbono aderidas a suportes de alumínio (*stubs*) e aspergidas com ouro usando um metalizador (EM SCD500, Leica).

Para analisar a morfologia das células SK-MEL-28 cultivadas em esferas de BNC pela microscopia confocal, foram utilizados DAPI [(4',6-diamidino-2-fenilindol), sal dicloridrato] e Alexa Fluor 546 conjugados com faloidina. Para tanto, esferas contendo as células SK-MEL-28 de diferentes tempos de incubação foram fixadas com formaldeído 4% por 2 h, seguida de lavagem com PBS por 3 vezes (5 min cada). As esferas foram seccionadas com tesoura cirúrgica e cada meia esfera obtida foi permeabilizada com Triton X-100 a 0,1% (em PBS), em quantidade suficiente para cobrir a meia esfera, por 5 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem com PBS por três vezes. Após, as amostras receberam 200 µL de albumina de soro bovino (BSA) 1% adicionado de 5 µL de faloidina e deixadas em repouso por 20 min, protegidas da luz. Então, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS. Em seguida, as amostras foram cobertas com DAPI solução (0,1% em PBS), incubadas por 30 segundos, seguido por lavagem com PBS por 3 vezes (5 min cada). A faloidina e o DAPI foram utilizados para colorir F-actina e núcleos celulares, respectivamente. As amostras foram montadas em lâminas com a utilização do meio de montagem Prolong[®] Gold, utilizado para manutenção da fluorescência das amostras. As imagens foram capturadas usando um microscópio confocal de varredura a laser (CLSM, modelo DMI6000 B, Leica) no LCME/UFSC.

A morfologia das células SK-MEL-28, cultivadas em membranas de BNC, foram acompanhadas por microscopia óptica (sistema EVOS Fluid - Life Technologies Corporation).

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.5.1 Extração do RNA total das células SK-MEL-28 cultivadas nas esferas de BNC

Para acessar o RNA total das células cultivadas no interior das esferas de BNC foram empregadas várias técnicas para ruptura das nanofibras de celulose, além da aplicação em cada amostra de 500 µL de tiocianato de guanidina e fenol em uma solução monofásica (TRIzol[®] Reagent) conforme o protocolo de uso do fabricante descrito a seguir. As técnicas utilizadas envolveram o uso de: esferas metálicas (*beads*); maceração manual; corte das esferas com tesoura cirúrgica; e o corte com tesoura seguido de tripsinização das células.

As técnicas foram aplicadas em triplicatas biológicas, incluindo nesta fase, além das BNC-TS de 6 mm que continham as células SK-MEL-28, cultivadas por 24h, também grupos de amostras compostos por esferas de BNC sem células, apenas meio de cultura DMEM e por células cultivadas em monocamada (2D). O RNA extraído dessas amostras foi então

quantificado por espectrofotômetro NanoDrop Lite (ThermoFischer). A técnica de extração que resultou em maior concentração de RNA por amostra foi empregada para as próximas etapas.

Assim, as novas amostras, agora BNC-TS de 7-8 mm, armazenadas nos tubos cônicos foram transferidas para tubos de centrifugação, contendo 4 esferas metálicas (*beads*) de ± 2 mm de diâmetro cada, previamente esterilizadas. Então, foram submetidas ao processo de ruptura estrutural e lise celular em MagNA Lyser (Roche) a 7000 rpm por 60 segundos, seguido de centrifugação por 5 min a 12000 rpm. Amostras de células cultivadas em monocamada, armazenadas em tubos cônicos, também foram centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. O sobrenadante dessas amostras foi transferido para novo tubo cônico que recebeu 100 μ L de clorofórmio, permanecendo em repouso por 3 min a temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados por 15 min a 12000 rpm, cuidadosamente angulados cerca de 45 ° para que a primeira porção do sobrenadante fosse transferida com auxílio de micropipeta para novo tubo cônico. Essa porção recebeu 250 μ L de isopropanol gelado. As alíquotas obtidas foram incubadas por 10 min a 4 °C e em seguida mantidas em ultra congelador a -80 °C por 2h, de modo a aumentar a quantidade de RNA capturado durante a precipitação com isopropanol. Após, as alíquotas foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi então descartado, o sedimento obtido foi lavado com 500 μ L de etanol 75% (v/v) e submetido ao vórtex por 3 segundos, seguido de centrifugação a 7500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e aguardada a secagem do sedimento em temperatura ambiente. Após, o sedimento foi dissolvido em 10 μ L de água (livre de RNase) e mantido no ultra congelador -80 °C. A concentração e a pureza das alíquotas de RNA obtidas foram avaliadas pelas proporções A260/280 e A260/230 em um espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare), sendo as proporções esperadas $> 1,8$ e $> 2,0$, respectivamente.

4.5.2 Expressão gênica

O RNA total, extraído das SK-Mel-28 cultivadas em BNC-TS, foi submetido ao ensaio de RT-qPCR (QuantStudio3, Applied Biosystems) em triplicata, usando o kit comercial – GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, #A6010), de acordo com as instruções do fabricante. Foram avaliadas as expressões relativas dos genes CDH1, BRAF e CDK4, usando o gene constitutivo GAPDH como gene referência. Os iniciadores foram usados na concentração final de 500 nM e suas sequências estão descritas na **Tabela 4**. A especificidade do produto amplificado (*amplicon*) foi verificada através da curva de dissociação (*melting*

curve). O ensaio foi realizado nas seguintes condições: 95 ° C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, para a desnaturação e encerrando com 1 min a 60 °C para anelamento e extensão da cadeia. Para todos os experimentos, o limiar de amplificação denominado de *Cycle threshold* (Ct) foi determinado automaticamente pelo software. A expressão relativa dos genes alvo calculada conforme o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando a plataforma BNC-TS-C com 3 dias de cultivo como calibrador dos experimentos. Foram consideradas expressões positivas (*upregulation*) para *Fold Change* FC > 1, e expressões negativas (*downregulation*) para FC < 1.

Tabela 4: Sequência dos iniciadores utilizados na RT-qPCR.

Gene	ID NCBI	Sequência 5' - 3'		Início	Final	A	E
BRAF	NG_007873.3	F	CTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGAT	33	65	63	92%
		R	CAACTGTTCAAACCTGATGGG	95	76		
CDH1	Z13009.1	F	GGTCTCTCTCACCACCTCCA	1483	1503	133	93%
		R	GGATGTGATTTCTGGCCCA	1615	1595		
CDK4	NM_000075.4	F	GTGTATGGGGCCGTAGGAAC	62	81	147	99%
		R	CCATAGGCACCGACACCAAT	208	189		
GAPDH	NM_002046.7	F	CACCCACTCCTCCACCTTTG	943	963	111	92%
		R	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	1053	1032		

Legenda: F: sequência *forward* (senso); R: sequência *reverse* (antissenso); A: amplificação; E: eficiência dos iniciadores.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

A atividade metabólica das células SK-MEL-28 e os resultados obtidos para expressão gênica foram analisados usando OriginPro® (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, EUA) expressos como a média ± desvio padrão da média de três ensaios independentes e suas triplicatas. A avaliação estatística foi realizada por meio da análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste de Tukey com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DAS PLATAFORMAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA

Esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana (BNC-TS) foram produzidas sob condições específicas de fermentação dinâmica da bactéria *K. hansenii* cultivada durante 3 e 5 dias a 1,7 Hz em meio mínimo. O aspecto translúcido do BNC-TS permaneceu sob cultivo dinâmico, utilizando meio de cultura de composição química definida com baixo custo (SPEROTTO et al., 2021). Outros pesquisadores obtiveram membranas de nanocelulose translúcida produzida em cultivo estático, utilizando o meio de cultura semelhante (DE SOUZA et al., 2019). A translucidez das esferas de nanocelulose produzidas sob fermentação dinâmica é uma das características fundamentais para o uso dessas plataformas esféricas na engenharia de tecidos, pois facilita a visualização das células no microscópio óptico. As esferas de nanocelulose produzidas até então, usando cepas do gênero *Komagataeinbacter*, valeram-se de meios de cultivo clássicos como Hestrin Schramm (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004) ou outros meios que variaram a fonte de carbono (MOHITE; PATIL, 2014; BRANDES et al., 2018), e resultavam em esferas opticamente opacas (ZHU et al., 2011; HU et al., 2018).

As esferas de nanocelulose normalmente são produzidas sob condições específicas de cultivo dinâmico. Neste estudo, utilizou-se o inóculo I produzido a partir da rota A, e ajustou-se a frequência de agitação (1,33 Hz - 2 Hz), bem como a concentração de inóculo (5% v/v – 15% v/v), respectivamente. A produção de esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana (BNC-TS) foi possível quando se utilizou 10% (v/v) de inóculo bacteriano sob agitação de 1,7 Hz. Corpos celulósicos não esféricos são produzidos quando a frequência utilizada não é 1,7 Hz. Nesses casos, a variação do parâmetro de frequência resultou na agregação de nanocelulose com formas semelhantes a estrelas, fiapos e corpos alongados, corroborando com as evidências encontradas por Brandes et al. (2018) e Mohite & Patil (2014) (MOHITE; PATIL, 2014; BRANDES et al., 2018).

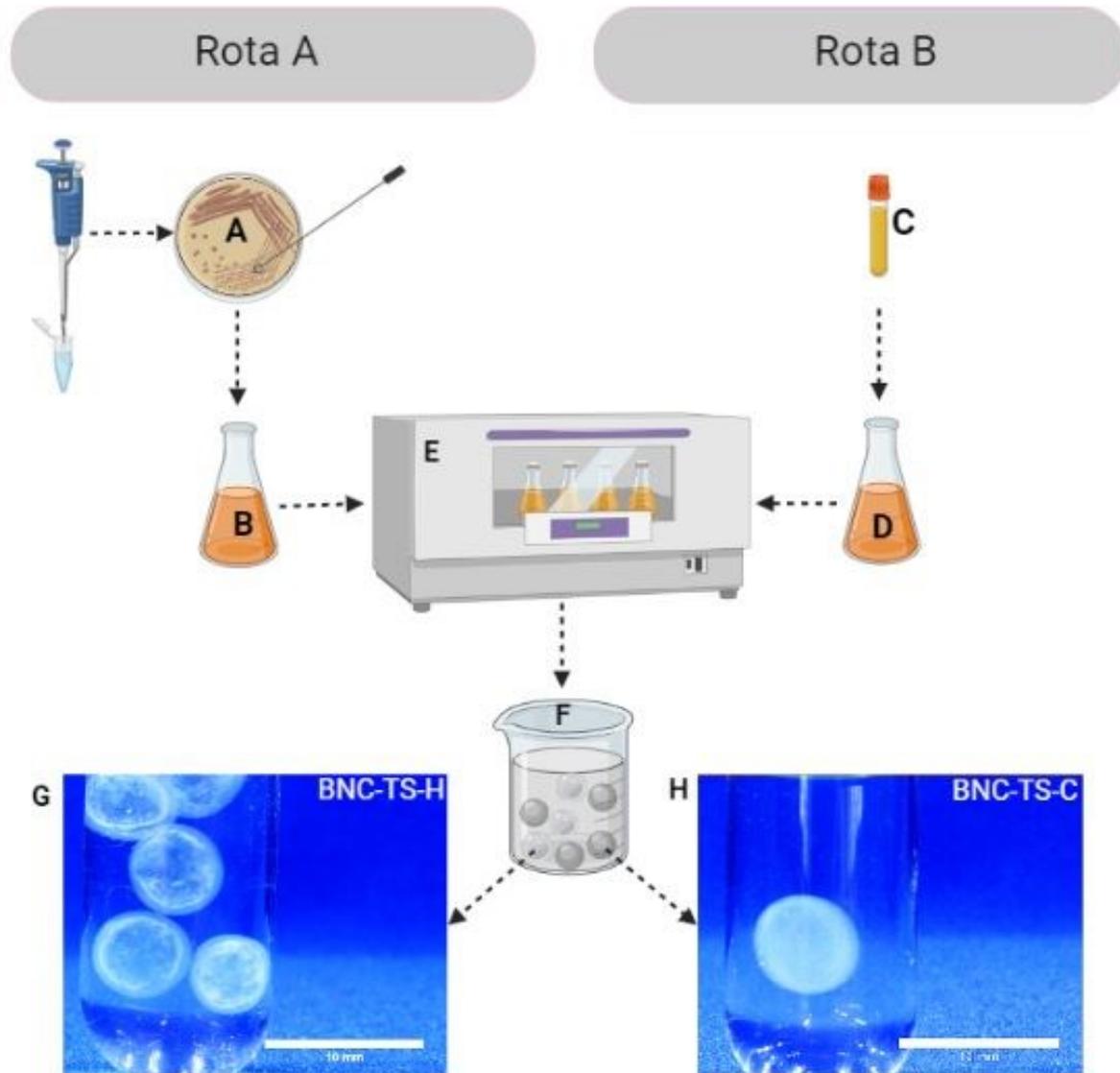
As BNC-TS apresentaram diâmetros que variaram de 6 a 10 mm e foram subdivididos em dois grupos, identificados como BNC-TS-C com compartimentação interna múltipla e BNC-TS-H com um único espaço interno limitado. A **Figura 3** mostra o esquema da produção das esferas e os respectivos grupos de BNC-TS após purificação. Através do procedimento proposto, foi possível produzir BNC-TS em frascos cônicos, dinamicamente incubados sob

temperatura de 26°C. A reprodutibilidade do processo produtivo foi confirmada através da repetição de dez bateladas independentes e consecutivas, o que foi superior ao indicado previamente na literatura (AYDIN; AKSOY, 2014). O aspecto final do meio de cultura, considerado adequado, era límpido sem a presença de precipitados. O pH final do meio esteve na faixa de 4,5 – 6,5; apresentando pelo menos uma esfera por frasco cônico. Esta é a primeira evidência na literatura sobre a produção de esferas translúcidas de nanocelulose sob condições dinâmicas de cultivo bacteriano utilizando meio mínimo.

Buscando uma diminuição no tempo de obtenção das BNC-TS, foi proposta uma alteração na rota de produção do inóculo utilizado. Assim, foram removidas as etapas de produção de placas de manutenção e placas de trabalho. O inóculo II – rota B, passou a ser produzido diretamente no ambiente de reativação da cepa, aumentando o volume de meio de cultivo e mantendo-o constante, semanalmente. As condições de fermentação dinâmica para produção das BNC-TS foram mantidas em 10% (v/v) de inóculo em meio mínimo de cultura, 26 °C e 1,7 Hz de agitação. Os parâmetros analisados foram os mesmos e não foram observadas alterações no aspecto límpido, ausência de sedimentos, tampouco no pH final do meio de cultivo, que se manteve na faixa de 4,5-6,5. Porém, o tempo de incubação de cada batelada experimental, necessário para se obter as BNC-TS com tamanhos entre 6 – 10 mm, reduziu de 5 para 3 dias. Essa alteração de rota produtiva também provocou um aumento no número de esferas obtidas por frasco cônico, que passou de 1 para pelo menos 2 unidades por frasco. Apesar da não investigação dos parâmetros de rendimento de esferas, a literatura sugere que isso foi possível porque o inóculo II poderia conter uma densidade maior de cepas que, combinadas com um maior suprimento de oxigênio fornecido pelo processo de agitação, pode ter originado maior rendimento de esferas por frasco (HU; CATCHMARK, 2010).

A partir desse mesmo inóculo II – rota B foram produzidas membranas de BNC sob condições estáticas de cultivo em placas de 24 poços. Foram obtidas membranas translúcidas após 7 dias de cultivo, com espessura média de $8 \pm 0,02$ mm (DE SOUZA et al., 2019). Essas membranas foram utilizadas nas etapas de cultivo celular, como plataforma 3D comparativa para morfologia e atividade metabólica.

Figura 3: Representação esquemática das rotas de produção das Esferas Translúcidas de Nanocelulose Bacteriana (BNC-TS), produzidas por *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) 10% (v/v), em meio mínimo de cultura por cinco e três dias a 1,7 Hz sob 26°C.



Legenda: Rota A-5dias: A) reativação da cepa, B) inóculo bacteriano I (10% v/v). Rota B-3dias: C) alíquota da cepa, D) inóculo bacteriano II (10% v/v). E) Fermentação dinâmica. F) Purificação. G) Esferas com espaço interno limitado único (BNC-TS-H¹). H) Esferas compartimentadas (BNC-TS-C²). As barras de escala para G e H são de 10 mm. Fonte: A autora

¹ BNC-TS-H: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana ocas, com um único espaço interno limitado.

² BNC-TS-C: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana que apresentam a região central multicompartimentada.

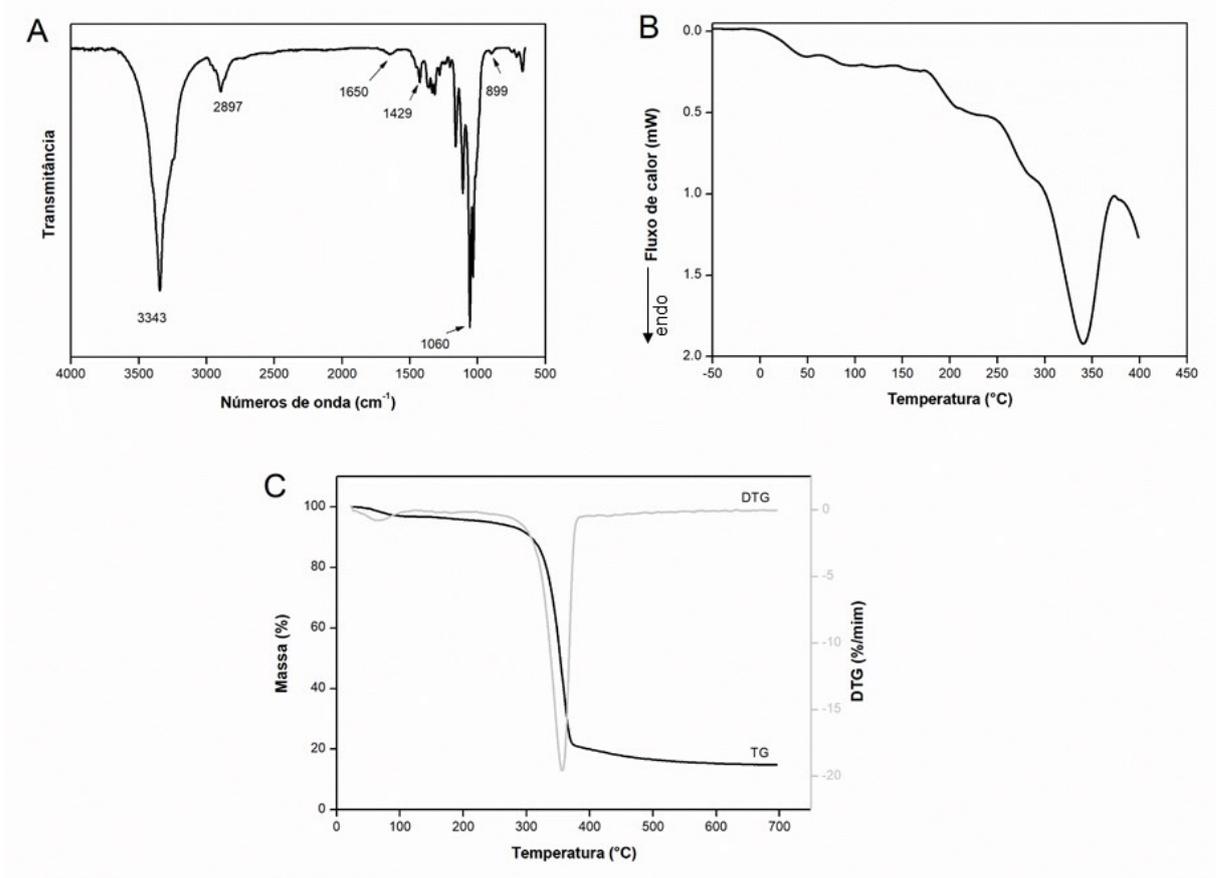
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DAS ESFERAS TRANSLÚCIDAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA (BNC-TS)

A literatura informa que meios de cultura distintos, variantes de parâmetros de processo ou cepas não produzem variação química no BNC (SINGHSA; NARAIN; MANUSPIYA, 2018; OSORIO et al., 2019a). Do mesmo modo que a purificação química com NaOH 0,1 M é eficaz para a produção de celulose pura (GEORGE et al., 2005). Contudo, buscou-se confirmar se a combinação de fermentação dinâmica e o uso de meio mínimo alteraria as características físico-químicas da nanocelulose resultante da biossíntese bacteriana.

A composição química da BNC-TS foi analisada por FTIR. A **Figura 4A** mostra as bandas do espectro em regiões típicas relacionadas à presença de celulose na região de 3343 cm^{-1} atribuída às vibrações de estiramento O-H dos grupos hidroxila. A banda em 1650 cm^{-1} correspondente à água absorvida (MOHITE; PATIL, 2014). Além dos estiramentos de C-H em 2897 cm^{-1} , uma banda em 1060 cm^{-1} que pode ser associada ao éter C-O-C; uma banda fraca e larga em 899 cm^{-1} (ligações β glicosídicas) e uma banda forte em 1429 cm^{-1} (deformações angulares CH₂) (BARUD et al., 2008; SUN et al., 2021), demonstram que os BNC-TS são quimicamente constituídos unicamente por celulose bacteriana (STUMPF et al., 2013; MOHITE; PATIL, 2014; BRANDES et al., 2018).

As amostras de BNC-TS foram submetidas aos ensaios de calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) e análise termogravimétrica (TGA) para avaliação das suas propriedades térmicas. O DSC mede o calor absorvido ou liberado por um material em função da temperatura ou do tempo (PA'E et al., 2019) e os resultados obtidos são mostrados na **Figura 4B**. Pode-se notar que a temperatura de transição vítrea (T_g) ocorre a temperatura de $44,7\text{ °C}$ (GEORGE et al., 2005) e a temperatura de degradação das BNC-TS foi de $342,8\text{ °C}$, confirmando dados da literatura para BNC quimicamente tratadas com NaOH (GEORGE et al., 2005; MOHITE; PATIL, 2014).

Figura 4: Avaliação físico química de Esferas Translúcidas de Nanocelulose Bacteriana (BNC-TS) produzidas em um agitador rotativo operando a 1,7 Hz por 5 e 3 dias a 26 °C.



Legenda: A) FTIR; B) DSC (endo: endotérmico) C) Espectro TGA. Fonte: A autora

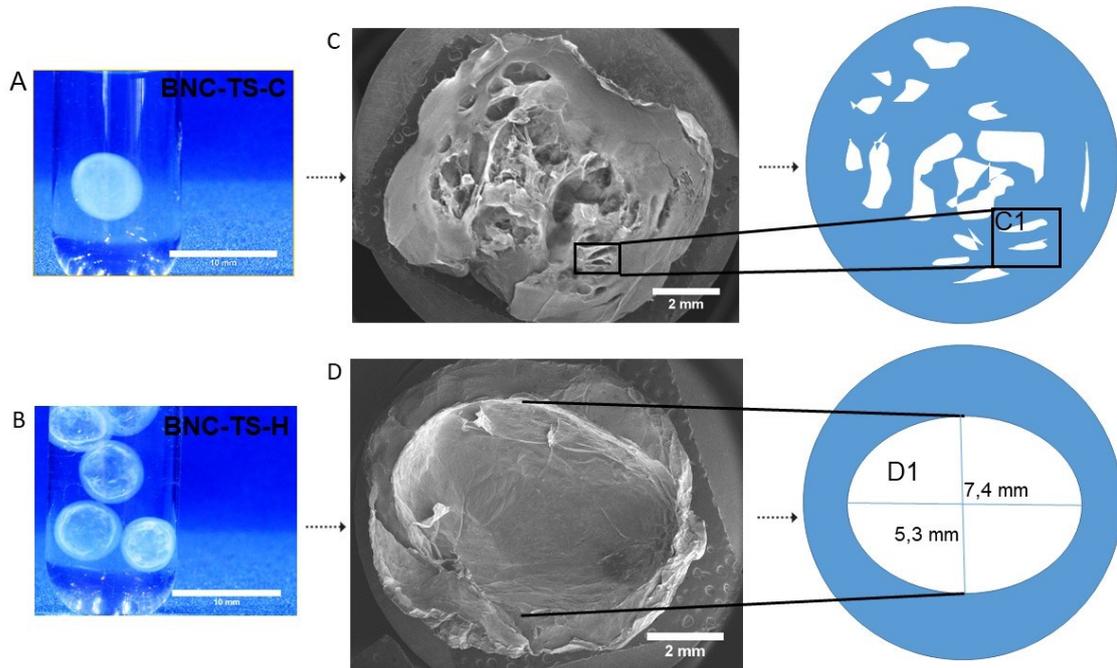
A análise termogravimétrica das BNC-TS (**Figura 4C**) mostra uma perda de cerca de 4% de massa na faixa de temperatura ambiente até 100 °C. Essa perda de massa pode estar associada à vaporização da água adsorvida nas amostras. A decomposição da nanocelulose (BNC) ocorre a 280-380 °C, que inclui de acordo com a literatura, desidratação, despolimerização das unidades glicosídicas e decomposição das unidades de glicose, seguida pela formação de um carbono residual, deixando ao final dessa faixa de temperatura cerca de 19% em peso residual (ZENG; LAROMAINÉ; ROIG, 2014; POTIVARA; PHISALAPHONG, 2019).

As propriedades estruturais do BNC, como tamanho e disposição das nanofibras, grau de cristalinidade (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; BI et al., 2014; HU et al., 2018) e morfologia (HU; CATCHMARK; VOGLER, 2013) são afetadas por variações no processo de produção (BRANDES et al., 2018). Essas variações também afetam a capacidade produtiva

(HU; CATCHMARK, 2010) e as características físicas e mecânicas do BNC (RECOUVREUX et al., 2011; AYDIN; AKSOY, 2014; MOHITE; PATIL, 2014).

Com base nisso, as características morfológicas das BNC-TS foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. A **Figura 5A e 5B** mostram as esferas produzidas em seu estado hidratado, acondicionadas em água purificada. Os resultados do corte transversal das BNC-TS-C e BNC-TS-H, após secagem em ponto crítico, explorando a parte interna das esferas estão mostrados nas **Figuras 5C e 5D**, seguidos respectivamente por sua representação esquemática (**C1 e D1**). A **Figura 5C** mostra detalhes microestruturais da BNC-TS-C com destaque para a região central multicompartimentada, composta por um emaranhado de nanofibras dispostas aleatoriamente em seu interior. A superfície, resultante desse desordenamento das nanofibras, mostra a presença de microporos, cuja área média superficial é de $114 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$. A **Figura 5D** mostra que as BNC-TS-H são esferas ocas que contém um espaço vazio central, delimitado por uma membrana com densa distribuição de nanofibras de BNC. Na BNC-TS-H as nanofibras estão ordenadas paralelamente, organizadas de maneira a contornar o espaço vazio central que se formou durante a incubação (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004). A área superficial disponível nesta BNC-TS é de $30,8 \text{ mm}^2$. As esferas aqui desenvolvidas apresentaram nanofibras com diâmetro médio de $11,5 \pm 2,2 \text{ nm}$, sem diferenças significativas entre as nanofibras presentes nas bordas ou nas regiões centrais de ambos os BNC-TS. Os pesquisadores avaliaram por microscopia eletrônica de varredura o diâmetro das nanofibras de celulose bacteriana produzidas em cultura estática por duas linhagens, *Gluconacetobacter xylinus* e *Gluconacetobacter europaeus*, obtendo um diâmetro médio de $18 \pm 2 \text{ nm}$ (ZENG; LAROMAINE; ROIG, 2014). Outros autores relatam que o diâmetro da nanofibra BNC foi medido entre 20 e 100 nm (KLEMM et al., 2018). As esferas desenvolvidas em cultura estática, utilizando superfícies hidrofóbicas para controle morfológico e utilizando a cepa *K. xylinus*, apresentam nanofibras com diâmetros que variam de 1,5 a 60 nm (LAROMAINE et al., 2018).

Figura 5: Características morfológicas das Esferas Translúcidas de Nanocelulose Bacteriana (BNC-TS).



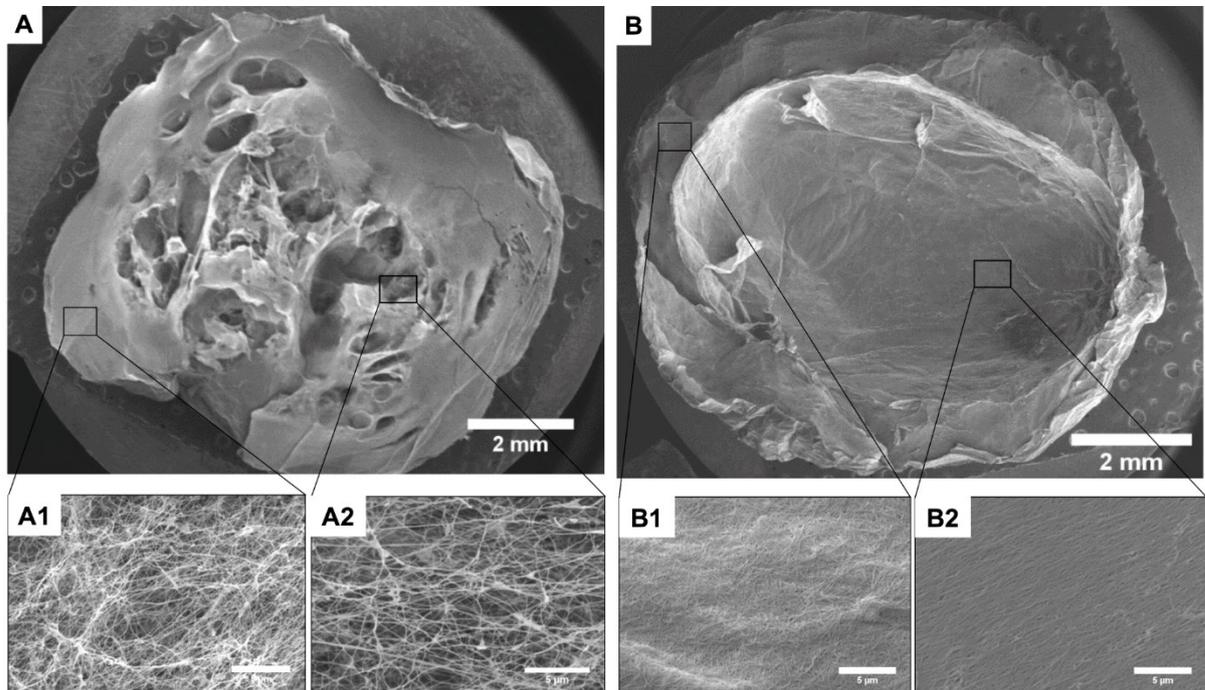
Legenda: A) BNC-TS-C³ e B) BNC-TS-H⁴, imersas em água destilada após purificação e autoclavação (as barras de escala para A e B são de 10 mm). As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, C e D, são de seções transversais das BNC-TS, juntamente com representações esquemáticas (C1 e D1). Fonte: A autora

A **Figura 6** mostra as ampliações das imagens das esferas produzidas e compara as regiões centrais com as regiões próximas às bordas em cada BNC-TS (**Figura 6A1 e 6A2; 6B1 e 6B2**, respectivamente). Podemos verificar que essas diferentes formas de organização das nanofibras dão origem a tamanhos médios de poros variáveis. A região central (**Figura 6A2**) do BNC-TS-C apresenta maior desorganização entre as fibras e, portanto, maior tamanho de poro, quando comparada à sua região de borda (**Figura 6A1**). A esfera oca aqui denominada BNC-TS-H, entretanto, mantém a mesma característica de porosidade, tanto na borda (**Figura 6B1**) quanto na região central da esfera, mostrando detalhes da organização paralela de suas fibras (**Figura 6B2**).

³ BNC-TS-C: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana que apresentam a região central multicompartimentada.

⁴ BNC-TS-H: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana ocas, com um único espaço interno limitado.

Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do corte transversal das esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana (BNC-TS).



Legenda: As micrografias A e B mostram BNC-TS-C e BNC-TS-H, respectivamente. A distribuição de nanofibras de nanocelulose nas bordas e na região central de cada esfera é mostrada nas micrografias A1, A2 e B1, B2, respectivamente (500x) (as barras de escala para A1, A2, B1 e B2 são de 5 μm). Fonte: A autora

Outros pesquisadores também observaram variações na microestrutura de esferas de nanocelulose produzidas por *Acetobacter xylinus* na presença de hemiceluloses e pectina (HU; CATCHMARK, 2010; GU; CATCHMARK, 2012). Variações na organização microestrutural das nanofibras são observadas em processos fermentativos estáticos e dinâmicos de plataformas de nanocelulose por outros pesquisadores da área (RECOUVREUX et al., 2011; BI et al., 2014; SINGHSA; NARAIN; MANUSPIYA, 2018). Macrocorpos de nanocelulose, produzidos em condições dinâmicas de cultivo bacteriano, foram caracterizados por fluido dinâmico. O grupo de pesquisadores mostrou a existência de compartimentos internos nesses macrocorpos, comprovando que existem áreas onde as nanofibras de nanocelulose encontram-se densamente organizadas (bordas) e nas regiões centrais essas nanofibras são mais porosas, ressaltando que a organização das nanofibras é inerente ao processo de fabricação de cada plataforma de nanocelulose (PORTO et al., 2019).

A caracterização microestrutural dos *scaffolds* 3D de nanocelulose é essencial quando a intenção é utiliza-los para engenharia de tecidos. Estruturas poliméricas construídas a partir de nanocelulose podem mimetizar a estrutura organizacional da matriz extracelular (MEC) (OLIVEIRA BARUD et al., 2015). Portanto, o diâmetro médio dos poros das BNC-TS também

foram avaliados, uma vez que alterações nas condições de cultivo, incluindo fonte de carbono, podem dar origem a diferentes arranjos de nanofibras (SALEH et al., 2020). Sabe-se que em um hidrogel fibroso como o composto por BNC, as nanofibras podem ser afastadas pela migração de células (BÄCKDAHL et al., 2006). Então, conhecer a distribuição e o tamanho dos poros da plataforma construída pode nos auxiliar a compreender melhor o comportamento celular (YANG et al., 2020). O tamanho de poro mais frequentemente encontrado para a borda da esfera compartimentada (BNC-TS-C) foi de $58,9 \pm 3,2$ nm e para a borda da esfera oca (BNC-TS-H) foi de $52,7 \pm 1,3$ nm. As regiões centrais apresentaram poros com tamanhos de $129,2 \pm 3,1$ nm para BNC-TS-C e de $52,9 \pm 1,2$ nm para BNC-TS-H. Esses resultados encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5: Área porosa, diâmetro da fibra na borda e região central do BNC-TS-C⁵ e BNC-TS-H⁶, obtidas das imagens MEV analisadas pelo software ImageJ[®].

Grupo	Região	Área porosa (nm ²)	Diâmetro da fibra (nm)
BNC-TS-C	A1	$58,85 \pm 3,21$	$11,2 \pm 2,7$
BNC-TS-C	A2	$129,2 \pm 3,05$	$8,6 \pm 2,6$
BNC-TS-H	B1	$52,68 \pm 3,05$	$12,8 \pm 3,0$
BNC-TS-H	B2	$52,87 \pm 3,05$	$13,5 \pm 2,7$

Fonte: A autora.

Essa diferença encontrada quando são comparadas as regiões centrais das esferas compartimentadas e ocas podem ser observadas também nas ampliações da **Figura 6**. O método de produção proposto aqui, portanto, possibilita a obtenção de esferas que, além de possuírem uma organização heterogênea no arranjo das fibras, fator importante para uma matriz 3D (OLIVEIRA BARUD et al., 2015), também oferece a possibilidade de se obter esferas com espaço interno oco, compartimentadas e de tamanho definido.

⁵ BNC-TS-C: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana que apresentam a região central multicompartimentada.

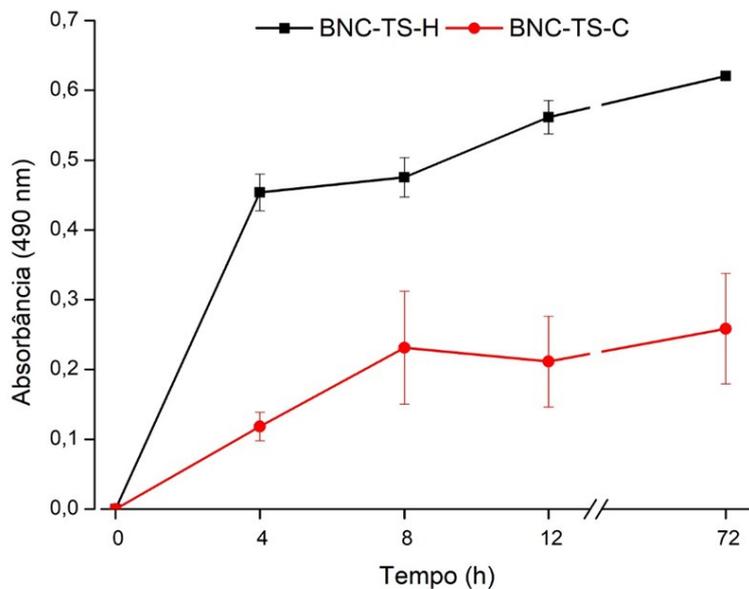
⁶ BNC-TS-H: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana ocas, com um único espaço interno limitado.

5.3 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO CELULAR NAS PLATAFORMAS DE BNC

Com relação às propriedades microestruturantes das BNC-TS, avaliou-se a possibilidade de usar essas esferas de nanocelulose como uma plataforma 3D arredondada para analisar o crescimento de células de melanoma. Considerando a ausência de nanofibras na parte interna das amostras de BNC-TS-H, a atividade metabólica das células de melanoma humano crescendo dentro do espaço vazio foi analisada. As células de melanoma humano foram injetadas em amostras de BNC-TS-C e BNC-TS-H em um número de 5×10^5 células/amostra.

A atividade metabólica das células SK-MEL-28 (ensaio MTS) foi investigada após 4, 8, 12, e 72 h de cultura celular *in vitro*, **Figura 7**. Após 4 h, as células de melanoma humano estavam 383% mais ativas metabolicamente quando cultivadas em BNC-TS-H do que em BNC-TS-C. Após 72 h de incubação, as células de melanoma humano cultivadas em BNC-TS-C mantiveram a mesma atividade metabólica observada às 8 h de cultura *in vitro*.

Figura 7: Ensaio MTS, mostrando a atividade metabólica das células SK-Mel-28, cultivadas em amostras de BNC-TS-H⁷ e BNC-TS-C⁸, durante 72 h de cultura *in vitro*.



Fonte: A autora

⁷ BNC-TS-H: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana ocas, com um único espaço interno limitado.

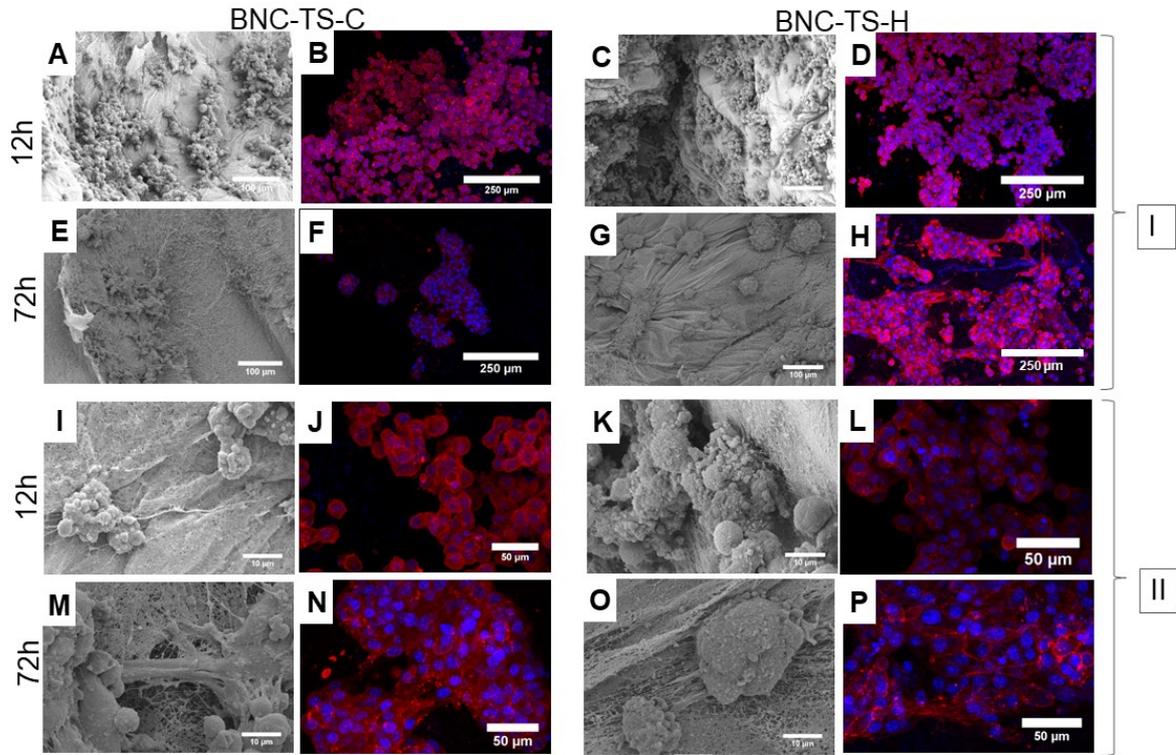
⁸ BNC-TS-C: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana que apresentam a região central multicompartmentada.

Esses achados destacam a importância da microestrutura dos *scaffolds* para as aplicações na engenharia de tecidos. Enquanto o BNC-TS-C fornece vários pontos de ancoragem da nanofibra para a ligação de células de melanoma humano, o BNC-TS-H oferece um espaço vazio. A plataforma BNC-TS-H aumentou a interação célula-célula, enquanto o BNC-TS-C parece fornecer interações célula-BNC mais eficazes. Como mostrado na **Figura 7**, a presença de pontos de ancoragem da BNC foi relevante para estabilizar a atividade metabólica das células de melanoma humano durante 72 h de cultivo. Ao final de 72 h, as células de melanoma humano estavam 240% metabolicamente mais ativas no BNC-TS-H do que no BNC-TS-C, **Figura 7**. Nossos resultados mostraram que a presença ou ausência de pontos de ancoragem dos biomateriais são relevantes para determinar a atividade metabólica das células de melanoma.

A **Figura 8** mostra micrografias MEV e imagens microscópicas confocais de células de melanoma humano cultivadas em BNC-TS-H e BNC-TS-C após 12 e 72 h de cultura *in vitro*. Essas células foram capazes de se ligar às nanofibras de BNC na região central do BNC-TS-C, enquanto as células cultivadas em BNC-TS-H aderiram umas às outras e às bordas das nanofibras da esfera do BNC.

A **Figura 8** mostra que, após 12 h de cultivo, tanto nas estruturas compartimentadas quanto nas ocas, as células SK-MEL-28 foram distribuídas dentro das esferas de BNC. Em uma visão geral, as células SK-MEL-28 aderiram às nanofibras internas das esferas da BNC-TS-C e à parede envoltória central da esfera oca (BNC-TS-H). Além disso, as SK-MEL-28 também aderiram entre si formando agregados celulares. A partir do ensaio MTS, fica claro que, após 12 h, a cultura de células SK-MEL-28 no interior das esferas ocas de nanocelulose (BNC-TS-H) era 265,5% metabolicamente mais ativa do que as células cultivadas no interior das esferas BNC-TS-C. Comparando a informação quantitativa da atividade metabólica das células SK-MEL-28 com os resultados obtidos por MEV e microscopia confocal, observou-se que ambas as amostras proporcionaram fortes interações célula-célula e célula-nanofibras. Essas imagens, capturadas por MEV e microscopia confocal, foram amplificadas para avaliar as características morfológicas das células SK-MEL-28 e sua interação com a rede de nanofibras dentro de BNC-TS-C e BNC-TS-H.

Figura 8: Micrografias MEV e imagens microscópicas confocais de células de melanoma humano (SK-MEL-28) cultivadas em BNC-TS-H e BNC-TS-C.



Legenda: Da esquerda para a direita, esferas de BNC compartimentadas (BNC-TS-C) e esferas de BNC ocas (BNC-TS-H), respectivamente. Os filamentos de actina-F foram corados com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e o núcleo corado com DAPI (azul). I) MEV e imagens confocais, usando ampliação de $200\times$ e $20\times$, para esferas BNC (BNC-TS) contendo SK-MEL-28 após 12 e 72 h de cultura. A barra de escala representa $100\ \mu\text{m}$ e $250\ \mu\text{m}$, respectivamente. II) MEV e imagens confocais, com ampliação de $2000\times$ e $63\times$, esferas BNC (BNC-TS) contendo SK-MEL-28 após 12 e 72 h de cultura. A barra de escala representa $10\ \mu\text{m}$ e $50\ \mu\text{m}$, respectivamente. Fonte: A autora

As imagens mostradas na **Figura 8** revelam a formação de agregados celulares após 12 h cultivando essas células em BNC-TS-C e BNC-TS-H, [**Figura 8 (A-D, I-L)**], onde as células SK-MEL-28 têm uma forma arredondada. Após 72 h de cultivo, as células aderiram às nanofibras de ambas as estruturas e apresentaram uma mistura de células com fenótipo arredondado, formas alongadas e presença de filopódios [**Figura 8 (E-H, M-P)**]. Observa-se que, após 72 h, as células apresentam uma morfologia mais alongada e seu citoesqueleto corado revela filamentos de actina sendo projetados entre as células, bem como grupos de células interagindo com nanofibras de BNC.

Diferentemente de outros *scaffolds* apresentados na literatura (KUZMENKO et al., 2013; MULLER et al., 2013; OLIVEIRA BARUD et al., 2015; COURTENAY et al., 2017; REIS et al., 2018; WANG et al., 2018), o modelo 3D desenvolvido aqui mostra a interação das células com a estrutura da matriz sem a necessidade de modificações químicas na rede de

nanofibras celulósicas. A composição polimérica foi mantida como nanocelulose pura e original, sem outras derivações ou modificações químicas produzidas a fim de aumentar a capacidade do BNC de mimetizar a MEC e fornecer uma configuração ideal para a adesão celular.

A BNC possui diferentes propriedades que podem ser aumentadas por modificações químicas, de acordo com sua aplicação (STUMPF et al., 2013; SHARMA; BHARDWAJ, 2019; POPA et al., 2022). Por exemplo, a interação célula-BNC foi verificada quando células-tronco mesenquimais (MSCs) foram cultivadas em estrutura 3D de membranas BNC. Essas células foram especialmente escolhidas nesse estudo, devido à capacidade de detectar seu ambiente bioquímico e biomecânico, em relação à proximidade com outras células (VIELREICHER et al., 2018). Outro estudo utilizou estruturas esféricas de BNC, obtidas estaticamente a partir do cultivo de *Komagataeibacter xylinus*, para cultivar células-tronco embrionárias de camundongos dentro de uma estrutura BNC esférica oca, indicando sua biocompatibilidade (LAROMAINE et al., 2018). Além disso, pesquisadores (HU; CATCHMARK; VOGLER, 2013) propuseram o uso de esferas BNC para o crescimento de células osteoblásticas humanas em sua superfície como proposta de engenharia de tecido ósseo.

Em outro estudo, a interação célula-célula e célula-matriz, caracterizada pelos agregados celulares e filopódios de células tumorais, injetadas no *scaffold* de BNC, são alcançadas apenas 3 dias após a cultura. É um modelo de membranas BNC, produzidas por cultivo estático, que também utilizou modificação química em nanocelulose para obter seu melhor desempenho de adesão (WANG et al., 2018). Comparativamente, nosso modelo mostrou forte adesão mesmo que para tempos de cultura curtos, por exemplo, por 12 h, como mostrado na **Figura 8**, e continua a manifestar essa característica mais fortemente ao longo do tempo de cultura celular.

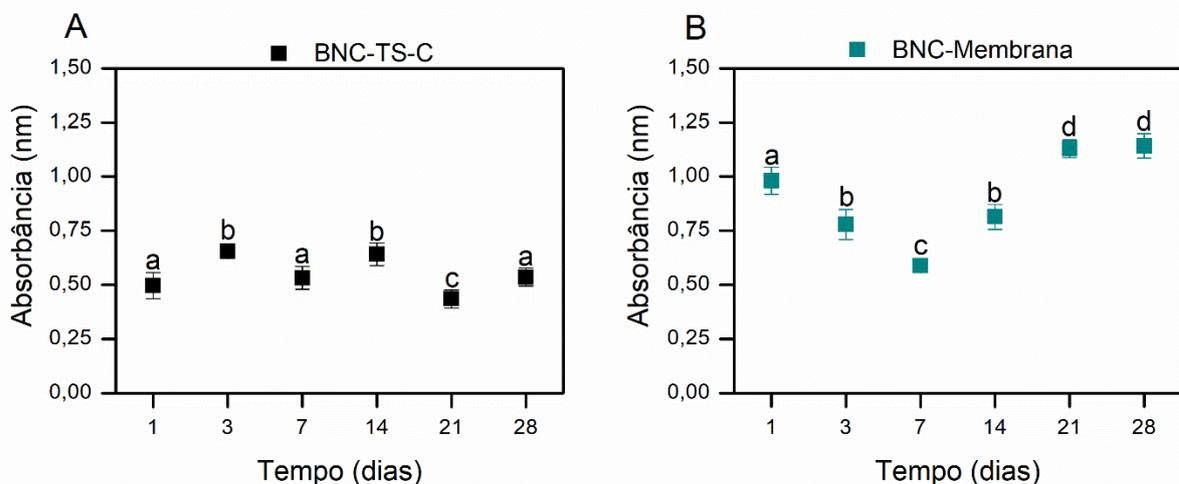
Portanto, a forma esférica e suas características intrínsecas como topografia e morfologia parecem favorecer a interação das células com as nanofibras, tornando-as estruturas convenientes para a construção de uma plataforma 3D para cultura de células, particularmente para modelos de crescimento de tumores, como no caso do melanoma. Esse formato permite a interação íntima célula-a-célula, de maneira tridimensional, devido à disposição natural das células em seu espaço interior. É precisamente esse espaço interno, limitado pela forma esférica e suas características morfológicas, que poderiam favorecer, por exemplo, os mecanismos indutores de hipóxia. Isso levaria essas células a induzir apoptose e a selecionar células

agressivas que expressariam fatores ligados a glicólise, angiogênese, interação célula-matriz, transição epitelial para mesenquimal e capacidade metastática como observadas por (LIVERANI et al., 2019) na matriz de colágeno tipo I para células de câncer de mama.

Avaliar a interação célula-matriz, através de eventos relacionados à proliferação e adesão, utilizando as células de melanoma SK-MEL-28, sabidamente agressivas, cultivadas nas estruturas desenvolvidas de BNC, ajudaria a compreender a validade da plataforma desenvolvida como futuro dispositivo para avaliação de candidatos a fármacos.

Considerando todas as propriedades discutidas acima, chama a atenção que as esferas compartimentadas favoreceram a interação célula-matriz e que as células se mantiveram ativas. Então, buscou-se saber se a plataforma proposta (BNC-TS-C) conseguiria sustentar maior densidade de células em seu interior e por quanto tempo isso seria possível. Também, qual o impacto da restrição de espaço e de pontos de ancoragem da plataforma esférica no comportamento celular. Assim, foi injetado o dobro da quantidade de células utilizadas nos primeiros ensaios, mantido o volume de injeção e o tamanho da esfera, o tempo total planejado foi de 28 dias de incubação. Comparativamente, foi semeada a mesma quantidade de células em membranas de BNC (24 poços) e mantido o mesmo tempo de cultivo. A **Figura 9** mostra o resultado alcançado no ensaio de atividade metabólica para ambas plataformas 3D. Pode-se observar distintos perfis de atividade metabólica nas diferentes plataformas.

Figura 9: Ensaio MTS, mostrando a atividade metabólica das células SK-Mel-28, cultivadas em amostras de BNC-TS-C e Membranas de BNC, durante 28 dias de cultura *in vitro*.



Legenda: Atividade metabólica de SK-MEL-28, cultivadas na densidade de 10^6 células por amostra por 28 dias, nas plataformas: A) BNC-TS-C: Esferas Compartimentadas de BNC. B) Membranas de BNC. (Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$). Fonte: A autora

Nas primeiras 24 h as células cultivadas em membrana de BNC são 98% mais ativas metabolicamente que as células cultivadas dentro da esfera de BNC. Após 3 dias de cultivo, há um aumento de 32% na atividade metabólica das células que estão enclausuradas nas esferas de BNC em relação ao primeiro dia. As células cultivadas nas membranas apresentam um declínio de 21% em relação ao seu primeiro dia, todavia, seguem 19% mais ativas que as células cultivadas dentro da esfera de nanocelulose.

Aos 7 dias de cultivo as células cultivadas nas esferas parecem retornar ao limiar de atividade encontrado do primeiro dia de cultivo, enquanto que o metabolismo das células cultivadas sobre as membranas de nanocelulose segue declinando. Aos 14 dias ambas plataformas demonstram aumento da atividade metabólica, ascendendo ainda mais nas plataformas membranares, enquanto que nas plataformas esféricas há nova queda aos 21 dias, seguido de um novo aumento aos 28 dias.

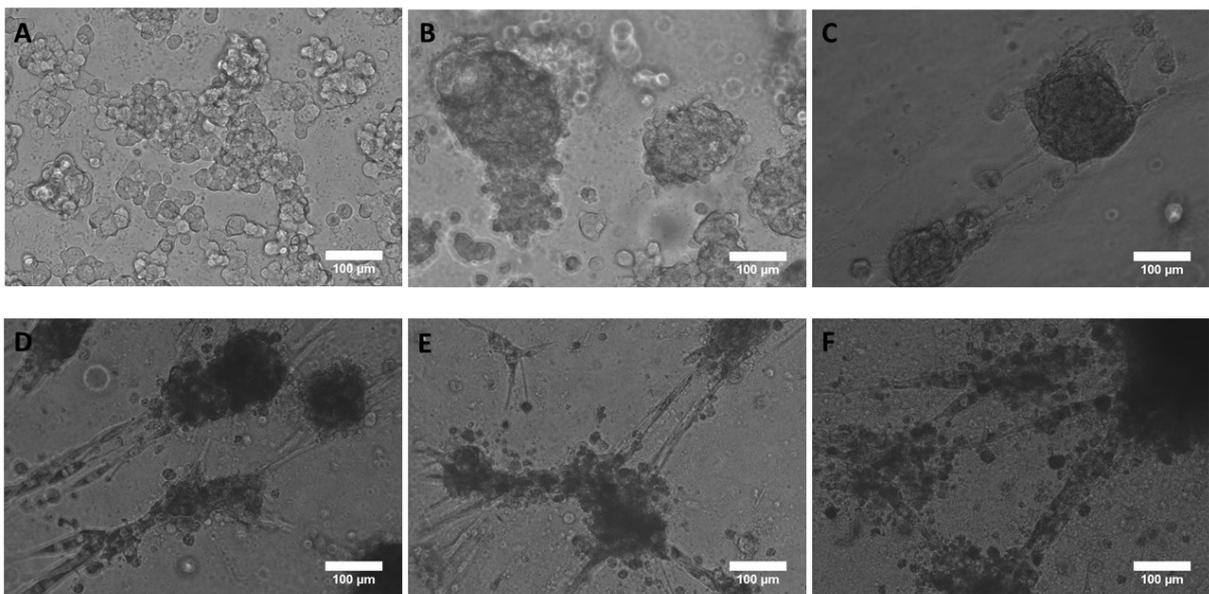
Através da microscopia óptica foi possível acompanhar a morfologia das células cultivadas sobre as membranas de BNC (**Figura 10**) e imagens por MEV e microscopia confocal mostraram as células cultivadas dentro das BNC-TS-C (**Figuras 11 e 12**, respectivamente). Os resultados parecem indicar que há, novamente, influência da estrutura nanofibrosa das diferentes plataformas sobre o perfil de atividade metabólica desenvolvido pelas células SK-MEL-28.

Nas imagens obtidas por microscopia óptica (**Figura 10**), as células cultivadas nas plataformas membranares de BNC, apesar do acesso facilitado aos nutrientes e ao oxigênio, percebem os efeitos da superfície nanofibrosa.

No primeiro dia de cultivo, as células parecem aglomerar (**Figura 10A**), e no terceiro dia esses, aglomerados celulares estão mais definidos (**Figura 10B**). No sétimo dia, esse comportamento resulta na formação de massas tumorais cuja interação célula-célula parece superar a interação célula-BNC (**Figura 10C**). Apesar das células terem sido cultivadas na superfície tecidual esponjosa da membrana, face com menor densidade de nanofibras (BÄCKDAHL et al., 2006; BERTI, 2012), parece haver dificuldade de adaptação dessas células a tal superfície nesses primeiros dias. Esse período de rearranjo e adequação celular confirma os resultados de queda mostrados nos ensaios de atividade metabólica. Pesquisadores que cultivaram SK-MEL-28 sobre membranas de BNC por 7 dias também perceberam a formação de aglomerados celulares e dificuldades de interação célula-BNC. Essa dificuldade foi superada pela imobilização química do peptídeo IKVAV nas fibras de BNC, o que melhorou a interação

célula-BNC, aumentou a adesão e proliferação das células tumorais (REIS et al., 2018). Outro estudo comparou o cultivo de células de câncer de ovário (A2780) em *scaffolds* membranares de BNC pura e de BNC impregnada com quitosana para avaliar a interação célula-célula e célula-BNC. O sucesso foi alcançado com os *scaffolds* de BNC impregnados com quitosana cujo desenho experimental previu 7 dias de cultivo (UL-ISLAM et al., 2019).

Figura 10: Imagens, obtidas por microscopia óptica, das células SK-MEL-28 cultivadas sobre membranas de BNC por 28 dias.



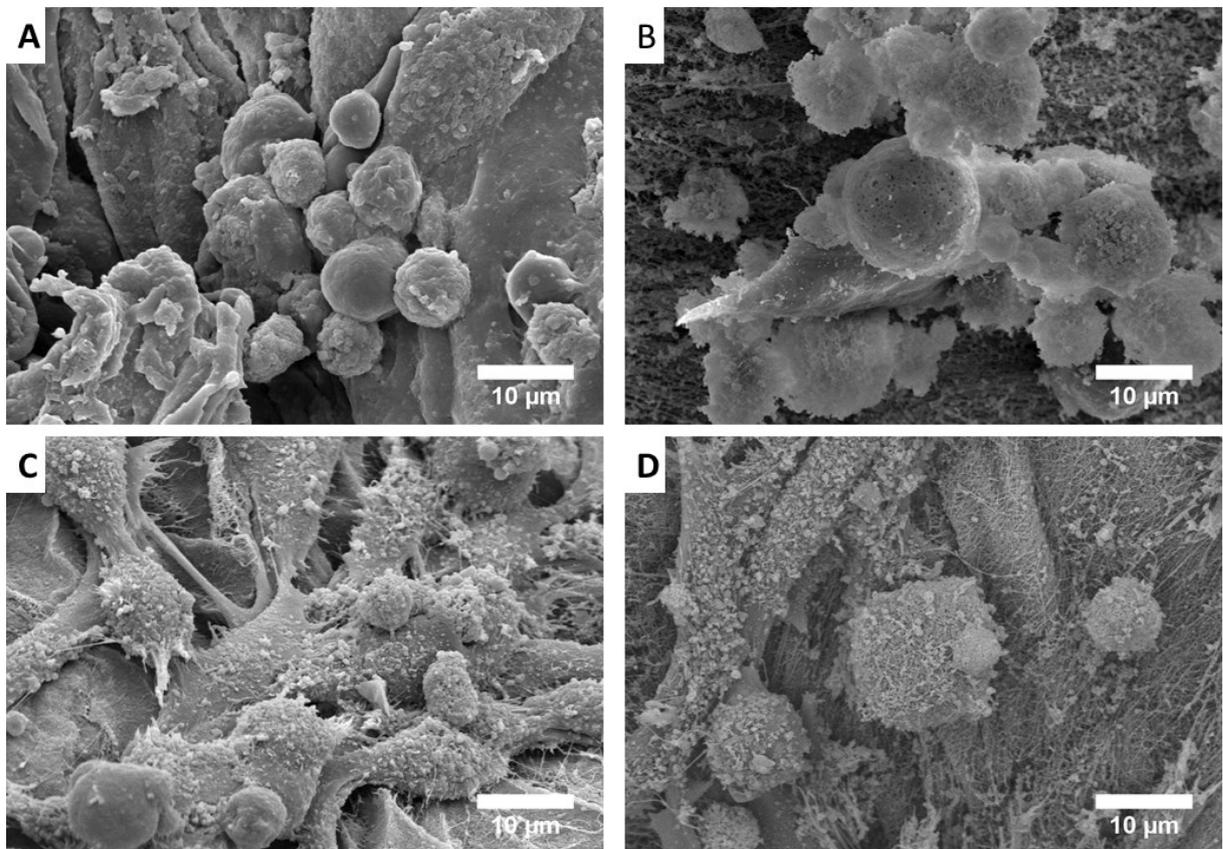
Legenda: Células SK-MEL-28, cultivadas sobre membranas de BNC, sendo A) 1 dia; B) 3 dias; C) 7 dias; D) 14 dias; E) 21 dias e F) 28 dias de cultivo. A barra de escalas representa 100µm. Fonte: A autora

A partir do sétimo dia, porém, mesmo com membranas de BNC pura, são observados prolongamentos e intercomunicação entre os aglomerados celulares. Essa alteração na morfologia dos aglomerados celulares mostram a capacidade adaptativa das células tumorais às características topográficas de escala nanométrica da plataforma (BAKER; CHEN, 2012). Após esse período, as células seguem aderidas, proliferativas e em atividade metabólica ascendente até os 28 dias programados (**Figuras 10D, E, F**), sem sofrer quaisquer limitações relativas ao espaço disponível para sobrevivência celular.

Nas plataformas esféricas BNC-TS-C, imagens obtidas por MEV (**Figura 11**) demonstram que a resposta das células SK-MEL-28 ao microambiente nanofibroso da esfera difere daquela obtida no cultivo em membranas de BNC. As células são influenciadas pelo interior compartimentado da BNC-TS-C e pela disposição aleatória das nanofibras. Quando comparado com o cultivo em plataformas membranares, o formato esférico confere espaço

delimitado e acesso diferenciado aos nutrientes e ao oxigênio pelas células. Apesar da nanocelulose permitir a passagem de oxigênio e nutrientes através de seus poros interconectados (BERTI, 2012; HALIB et al., 2019) a camada externa de BNC, responsável pelo formato esférico da plataforma, também influenciou os momentos de adaptação celular a esse microambiente.

Figura 11: Micrografias MEV de células de melanoma humano (SK-MEL-28) cultivadas nas plataformas BNC-TS-C⁹ por 1; 7; 14 e 21 dias.



Legenda: A) 1 dia; B) 7 dias; C) 14 dias e D) 21 dias de cultivo, com ampliação de 2000×. A barra de escala representa 10µm. Fonte: A autora

A **Figura 11A** mostra que no primeiro dia de cultivo as forças de adesão célula-célula se sobrepõe as de interação célula-BNC. Podemos visualizar agregados celulares e o início do processo de reconhecimento e adesão ao microambiente nanofibroso. No sétimo dia (**Figura 11B**), assim como verificamos uma queda na atividade metabólica, as micrografias mostram as

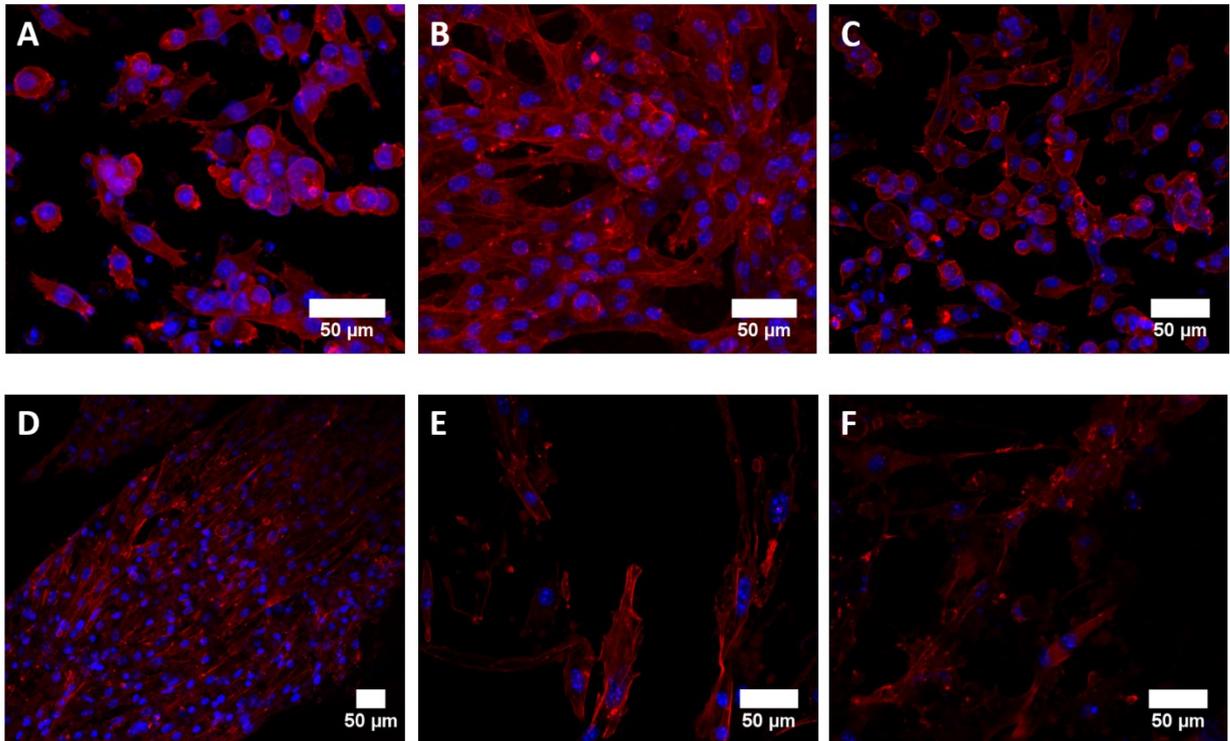
⁹ BNC-TS-C: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana que apresentam a região central multicompartimentada.

células morfológicamente arredondadas, formando agregados com poucos pontos de adesão à estrutura nanofibrosa da BNC-TS-C. Outros pesquisadores também atribuíram a queda na viabilidade celular às frouxas interações entre as células tumorais e as redes nanofibrosa de BNC (UL-ISLAM et al., 2019). Todavia, o perfil morfológico muda quando atingimos o décimo quarto dia de incubação (**Figura 11C**). Neste momento, as células se apresentam interagindo mais intimamente às nanofibras de BNC e fortemente aderidas, o que é evidenciado pela presença de prolongamentos celulares. Essa morfologia é acompanhada pelos dados mostrados de aumento da atividade metabólica. Não foi possível obter micrografias do terceiro dia de cultivo para ilustrar o possível comportamento celular. Mas, numericamente, a atividade metabólica das células com 3 e com 14 dias estão no mesmo patamar e não apresentaram diferença significativa, o que pode indicar um comportamento morfológico semelhante, mais ativo metabolicamente que os demais momentos observados. As micrografias mostram ainda o que aos 21 dias de cultivo (**Figura 11D**) há diminuição da densidade celular e as células estão distantes umas das outras, apresentando morfologia arredondada com pouca interação com a superfície da BNC. Menos ativas, parecem estar sofrendo negativamente os impactos do espaço interno limitado, sendo necessária nova fase de readaptação.

As imagens obtidas por microscopia confocal, e apresentadas na **Figura 12**, mostram as morfologias celulares para os tempos de cultivo programados de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. O emprego dessa técnica busca ilustrar as junções intercelulares e o resultado da interação célula-BNC (VANSLEMBROUCK et al., 2022).

Assim como nas micrografias obtidas por MEV, as células apresentam morfologia diversa para cada tempo de cultivo, correspondendo aos períodos de reconhecimento do microambiente nanofibrilar, onde há aglomerados celulares compartilhando espaço com células que iniciaram a adesão na estrutura de BNC (**Figura 12A**).

Figura 12: Imagens microscópicas confocais de células de melanoma humano (SK-MEL-28) cultivadas em BNC-TS-C¹⁰ por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.



Legenda: Imagens confocais (20×) de SK-MEL-28 com A) 1 dia; B) 3 dias; C) 7 dias; D) 14 dias; E) 21 dias; F) 28 dias de incubação, em esferas de BNC (BNC-TS-C). Os filamentos de actina-F foram corados com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e o núcleo corado com DAPI (azul). A barra de escala representa 50 μm. Fonte: A autora

Após a adesão, há intensa atividade metabólica, proliferação e o alinhamento celular. Os filamentos de actina confirmam a acomodação celular ao microambiente esférico e a formação de multicamadas celulares que preenchem o espaço delimitado disponível (**Figura 12B**). Na **Figura 12C**, as células refletem o esforço para vencer a limitação de espaço, alguma dificuldade de acesso aos nutrientes e oxigênio. Os filamentos de actina estão retraídos e a morfologia celular está arredondada, com aglomerados celulares presentes e com queda na atividade metabólica. Porém, há um rearranjo celular na **Figura 12D**, correspondente aos 14 dias de incubação, onde as células se encontram ativas, proliferativas e a morfologia se semelha ao mostrado na **Figura 12B**. O microambiente torna possível novamente a formação de multicamadas e alinhamento celular. Na terceira semana de incubação as imagens mostram poucas células no campo da microscopia confocal, período que correspondeu também a menor

¹⁰ BNC-TS-C: esferas translúcidas de nanocelulose bacteriana que apresentam a região central multicompartmentada.

taxa de atividade metabólica observada (**Figura 12E**). A **Figura 12F** ilustra os 28 dias de incubação e propõe o início de nova etapa de acomodação para as células que permaneceram viáveis até aqui.

Na cultura de células 3D, uma plataforma de cultura adequada deve ser capaz de imitar componentes da matriz extracelular (MEC), fornecendo suporte estrutural com propriedades semelhantes à MEC nativa e uma rede de poros interconectados para ancoragem celular eficiente e transferência de nutrientes e oxigênio às células (RODRIGUES et al., 2021).

É sabido que a remodelação dos filamentos de actina traduzem processo de adequação das células ao seu microambiente, *in vitro* e *in vivo*, e tem relevância na cascata de eventos da carcinogênese como a angiogênese, proliferação, invasão (IZDEBSKA et al., 2020).

A plataforma esférica desenvolvida impôs às células diferentes estágios do cultivo celular. As diversas morfologias, traduzidas pelos filamentos de actina, mostram momentos em que as células estão interagindo tridimensionalmente entre si ou mais fortemente com a BNC. Porém, a proliferação é interrompida pelo espaço delimitado que impede que esse comportamento perdure. Então, a sobrevivência celular diminui o suficiente para dar espaço para novas células, e novos estágios proliferativos se iniciam a partir das células remanescentes. A modulação das estruturas do citoesqueleto de actina são reflexos da regulação dinâmica das funções celulares típicas de células aderentes. Durante a interfase, as células estão aderidas e se espalham assumindo a forma suportada pelo citoesqueleto de actina, e durante a mitose, assumem formato arredondado com maior rigidez cortical. Esses sinais bioquímicos são traduzidos a jusante nas taxas de atividade metabólica das células (EBATA; HIRATA; KAWAUCHI, 2016).

5.4 EXPRESSÃO GÊNICA

A capacidade de adesão e proliferação das células de melanoma humano nas plataformas BNC-TS-C também foram avaliadas com base na expressão relativa dos genes de adesão CDH1 e de proliferação BRAF e CDK4.

Para obtenção do material genético de interesse (RNA) foram empregadas várias técnicas que mesclaram força mecânica e reagentes químicos. A **Tabela 6** informa a quantidade de RNA total obtido nos ensaios iniciais, de acordo com o método mecânico empregado no processo de extração.

Tabela 6: Resultados das extrações de RNA das células SK-MEL-28, cultivadas em BNC-TS com 6 mm de diâmetro.

Método	Amostra	260/280	Concentração (ng/μL)
Esferas metálicas	1	1.990	747,9
	2	2.020	1229,0
	3	*	*
Maceração manual	4	1.940	771,6
	5	1.980	540,2
	6	1.910	926,2
Secção com tesoura cirúrgica	7	1.950	287,7
	8	1.930	262,2
	9	1.950	544,3
Secção + tripsinização	10	1.940	181,0
	11	1.970	428,4
	12	1.840	40,2
BNC-TS sem células	13	1.940	16,8
Meio DMEM sem células	14	2.050	12,3
Células cultivadas em monocamada	15	1.990	1336,1

Nota: *leitura indisponível (amostra escura). Fonte: A autora

A plataforma de BNC é composta por 99% de água (CURVELLO; RAGHUWANSHI; GARNIER, 2019; R et al., 2021), o que torna árdua a tarefa de remoção de moléculas hidrofílicas, tais como os ácidos nucleicos, de sua estrutura nanofibrosa. Ávila, et. al (2015) obtiveram sucesso extraíndo material genético de plataformas 3D de BNC, porém, membranares (MARTÍNEZ ÁVILA et al., 2015), diferentemente da estrutura tridimensional apresentada neste trabalho. Ainda, durante o estudo sobre os mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese de BNC, De Souza (2017) relata as dificuldades enfrentadas para obter RNA de alta qualidade de células de bactérias *K. hansenii*, devido à grande quantidade de polissacarídeos e fibras (DE SOUZA, 2017). Os polissacarídeos podem interferir nos ensaios de expressão gênica, inibindo as reações em cadeia de polimerase (PCR), reduzindo a capacidade de ressuspensão do RNA extraído ou perturbando o processo enzimático (SCHRADER et al., 2012). O método de extração escolhido para obter o RNA das células cultivadas nas BNC-TS foi o que empregou a combinação do reagente Trizol e esferas metálicas, uma vez que foram obtidas a maior concentração e ao mesmo tempo maior pureza

do RNA extraído, medindo a absorbância em 260 nm para determinação da concentração; bem como cálculo das razões 260/280 (A260/280) e 260/230 (A260/230) para avaliação da pureza do RNA (SCHRADER et al., 2012; SINITSKY et al., 2018). Assim, as novas amostras de BNC-TS contendo células de melanoma humano foram submetidas ao processo de extração de RNA e os resultados das quantificações estão sumarizados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Resultados da extração de RNA total de células SK-MEL-28, cultivadas em BNC-TS e em monocamada (2D).

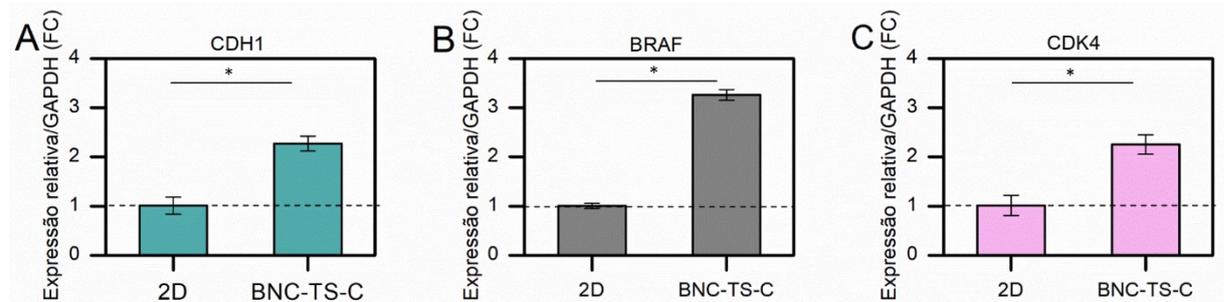
Amostra	260/280	260/230	Concentração (ng/μL)
1 dia rep. 1	1.975	1.837	901,0
1 dia rep. 2	1.512	1.248	729,2
1 dia rep. 3	2.015	1.849	1148,0
3 dias rep. 1	1.961	1.431	640,0
3 dias rep. 2	1.993	1.486	682,0
3 dias rep. 3	1.999	1.315	877,2
7 dias rep. 1	1.960	1.521	489,2
7 dias rep. 2	1.936	1.122	324,4
7 dias rep. 3	2.014	1.897	744,4
14 dias rep. 1	1.931	1.839	156,0
14 dias rep. 2	1.948	1.024	271,0
14 dias rep. 3	1.888	1.827	168,4
21 dias rep. 1	1.937	1.699	158,8
21 dias rep. 2	1.896	1.240	87,2
21 dias rep. 3	1.907	1.730	171,6
28 dias rep. 1	1.845	1.760	109,2
28 dias rep. 2	1.833	1.757	170,8
28 dias rep. 3	1.917	1.682	92,8
2D-3 dias rep. 1	1.980	1.000	4969,0
2D-3 dias rep. 2	1.870	1.730	4665,0
2D-3 dias rep. 3	1.920	1.122	2854,0

Legenda: rep.: replicata. Fonte: A autora

A superfície dos materiais podem influenciar o comportamento celular desde a adesão até a expressão gênica (WANG et al., 2021). Portanto, para conhecermos a influência da plataforma de BNC sobre a capacidade de adesão e proliferação das células, iniciamos os estudos comparando a expressão desses três genes nas células SK-MEL-28 cultivadas em

monocamada (2D) e em BNC-TS-C após 3 dias de cultivo. Este tempo foi escolhido porque com 72 h de cultivo tanto as células cultivadas em 2D quanto as células cultivadas em BNC-TS-C já superaram os processos de adesão, e após esse período a sobrevivência celular no cultivo em monocamada seria prejudicada pelo aumento exponencial no número de células cultivadas na placa (RAVI et al., 2015). Assim, a **Figura 13 (A, B e C)** ilustra os resultados alcançados e demonstra que os genes CDH1, BRAF e CDK4 estão relativamente mais expressos em células incubadas nas plataformas BNC-TS-C que quando cultivadas em monocamada pelo mesmo período de incubação.

Figura 13: Análise da expressão gênica de células de melanoma humano (SK-MEL-28) semeadas em monocamada (2D) e em plataformas BNC-TS-C (3D), após 3 dias de cultivo.



Legenda: Níveis de expressão gênica de A) CDH1, B) BRAF e C) CDK4 em relação ao gene constitutivo GAPDH (n=3, as barras de erro representam o desvio padrão da média e * diferença significativa, $p < 0,05$). Fonte: A autora.

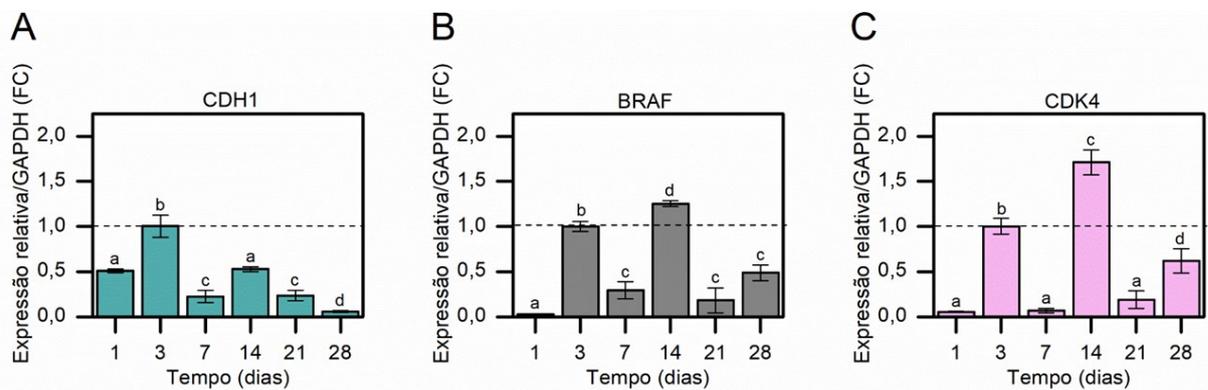
Em seguida, foram avaliadas as expressões gênicas das células SK-MEL-28 cultivadas nas plataformas BNC-TS-C, por 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias (**Figura 14 A, B e C**) para os mesmos marcadores de adesão e proliferação. A **Figura 14A** ilustra o perfil de expressão do gene CDH1, marcador de adesão, que desempenha papel importante na tumorigênese uma vez que atua na manutenção do contato célula-célula e coesão dos tecidos (GALL; FRAMPTON, 2013). Apesar de expresso no primeiro dia de incubação, o gene CDH1 apresentou maior expressão no terceiro dia, seguido de queda (4,5 vezes menos expresso) no sétimo dia de incubação das células. No decorrer do experimento, com 14 dias de incubação, o gene CDH1 se apresenta 2,3 vezes mais expresso que em sete dias, porém esse aumento alcança valores comparáveis a aqueles encontrados no primeiro dia, sem diferença significativa. Os demais períodos observados mostraram queda nos níveis de expressão do gene de adesão.

A **Figura 14B** revela o perfil de expressão do gene BRAF, marcador de proliferação celular (STRICKLAND et al., 2015), ao longo dos 28 dias de experimento. Pode-se observar

que no terceiro dia o gene está 35,5 vezes positivamente mais expresso que no primeiro dia de incubação. E, apesar de apresentar queda com expressão negativa para o sétimo dia (3,7 vezes menos expresso), o gene torna a ser expresso positivamente no décimo quarto dia de incubação (1,3 vezes mais expresso). Nos demais tempos o perfil mostra expressão gênica negativa, sem diferenças significativas entre os períodos.

O perfil de expressão do gene CDK4 está na **Figura 14C**. Marcador de proliferação (GARUTTI et al., 2021), nota-se que o gene está mais expresso no terceiro e décimo quarto dia (1,7 vezes mais expresso positivamente que em 3 dias). O perfil desse gene também apresenta flutuações, mostrando queda de expressão no sétimo dia (14,2 vezes menos expresso que em 3 dias), aproximando os resultados daqueles mostrados para o primeiro dia de incubação. Em 14 dias há expressão positiva, sendo 24,2 vezes mais expresso que no sétimo dia, seguido de expressão negativa (8,9 vezes menos expresso) no vigésimo primeiro dia e breve aumento em 28 dias (1,6 vezes menos expresso que em 3 dias).

Figura 14: Expressão gênica de células SK-MEL-28 cultivadas na plataforma BNC-TS-C por 28 dias.



Legenda: Níveis de expressão gênica de CDH1, BRAF, CDK4 em relação ao gene constitutivo GAPDH. Sendo em A) CDH1, B) BRAF e C) CDK4 as expressões gênicas das células SK-MEL-28, cultivadas por 28 dias em BNC-TS-C. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).
Fonte: A autora

Comparando os níveis de expressão das células SK-MEL-28, incubadas na plataforma BNC-TS-C, para os genes escolhidos, parece possível afirmar que no primeiro dia de incubação há predominância do fenótipo de adesão, considerando que, apesar das expressões negativas, CDH1 se apresenta 18 vezes mais expresso que o BRAF e 9 vezes mais expresso que o CDK4, ambos marcadores de proliferação. Resultados que apontam para o reconhecimento e adaptação das células às nanofibrilas de BNC (YANG et al., 2020).

Como o terceiro dia foi utilizado como calibrador do experimento, não é possível apontar a razão de expressão entre os genes escolhidos, mas mostrar que há expressão tanto do gene CDH1, quanto dos genes BRAF e CDK4. Esses resultados confirmam a plasticidade fenotípica das células de melanoma relatada por outros pesquisadores que apontam expressão positiva para CDH1 em células proliferativas, mantendo persistentemente a morfologia epitelióide (JOSHI; HORNYAK, 2020; WENZINA et al., 2020). Nos ensaios anteriores o período de 3 dias apresenta intensa atividade metabólica e as imagens obtidas por microscopia confocal mostram células com morfologia proliferativa (epitelióide), mas também há células fusiformes, o que indicaria fenótipo invasivo, o que não foi investigado neste estudo. Em sete dias, há queda expressiva de todos os marcadores, dados que corroboram com os experimentos anteriores que indicaram queda na atividade metabólica e menor interação célula-BNC para esse período.

No décimo quarto dia de incubação, o fenótipo proliferativo supera novamente os demais marcadores. O gene CDK4 está 1,4 vezes positivamente mais expresso que o gene BRAF e 3,2 vezes mais expresso que o gene CDH1. O gene BRAF, por sua vez, está 2,4 vezes positivamente mais expresso que o CDH1. As células proliferam conforme a delimitação do espaço interno da esfera BNC-TS-C permite, o que parece causar impacto importante sobre as células visto que, com vinte e um dias de incubação, há queda nos níveis de expressão desses marcadores, os quais apresentam expressão negativa para o período. Com 21 dias de incubação os genes parecem retornar aos níveis de expressão alcançados com sete dias de experimento, apresentando o gene CDH1 com 1,3 vezes mais expresso que o gene BRAF e 1,2 vezes mais expresso que o gene CDK4, e o fenótipo de adesão prevalece. Novamente, há correlação com os dados de redução da atividade metabólica e diminuição da densidade celular mostrada nas imagens obtidas por MEV e confocal. Quando o experimento alcança o vigésimo oitavo dia de incubação o fenótipo proliferativo está presente, pois o gene CDK4 está 10,6 vezes mais expresso que CDH1 e 1,3 vezes mais expresso que BRAF, mas as imagens confocais também revelam células fusiformes, porém, marcadores de invasão não foram objeto do estudo.

A ligação de células à matriz extracelular (ECM) ou outras células tem sido implicada na regulação do ciclo celular (SALVATIERRA et al., 2015). A plataforma BNC-TS-C mostrou flutuações importantes na expressão de CDH1, características marcantes de células tumorais, onde a transição entre momentos de adesão e as alterações de polaridade membranar reorganizam o citoesqueleto de actina. Essa sinalização garante a plasticidade e capacidade de

adaptação celular a diferentes ambientes. Nos epitélios malignos, o descontrole da cooperação entre a actina e as adesões pode resultar na perda da organização epitelial polarizada e aumento na capacidade de invasão e disseminação (HENG; KOH, 2010; KOVAC; MÄKELÄ; VALLENIUS, 2018). Ainda, foi possível manter na plataforma a presença de regulação positiva dos processos de transcrição controlados por cinases dependentes de ciclinas, como no marcador CDK4, que promove a transição do ciclo celular G1-S, assim como do marcador BRAF, ambos reguladores colaborativos da proliferação celular típicas do melanoma (SHEPPARD; MCARTHUR, 2013; GUO et al., 2020; GARUTTI et al., 2021).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Plataformas bidimensionais para cultura de células são incapazes de reproduzir o microambiente tumoral *in vitro*. Na busca por plataformas e materiais ideais para estudar o complexo microambiente tumoral, propôs-se um novo método para produzir uma plataforma esférica translúcida composta por nanocelulose bacteriana. Este método originou dois tipos de esferas de nanocelulose bacteriana que, inicialmente, foram utilizadas em paralelo para cultivo de SK-MEL-28 *in vitro* por 72 h. As diferenças entre essas plataformas (BNC-TS-H e BNC-TS-C) estão no espaço interno disponível (única cavidade) e no arranjo das nanofibras hierarquicamente distribuídas (múltiplas cavidades dispostas). Os primeiros resultados mostraram que as células tumorais foram capazes de aderir à matriz e demonstrar interações tridimensionais típicas célula-célula e célula-matriz em ambas as plataformas, além de manter sua atividade metabólica ao longo das 72 h de observação planejadas. No entanto, a esfera oca privilegiou as interações célula-célula, enquanto que na esfera compartimentada prevaleceram as interações célula-BNC, ou seja, o microambiente interno das plataformas esféricas produzidas é relevante para determinar o destino das células tumorais.

Assim, o estudo realizado no microambiente da esfera compartimentada (BNC-TS-C), com maior densidade celular e 28 dias de incubação, confirma que o comportamento celular é afetado pelas condições espaço-tempo disponíveis para a adesão e proliferação. Ao longo dos 28 dias de avaliação as células apresentaram flutuações na atividade metabólica, perfil morfológico, cujos resultados alcançados estão refletidos nos ensaios de expressão gênica. Esse comportamento flutuante pode oportunizar distintos momentos de estudo do microambiente tumoral e atender a diferentes necessidades dos pesquisadores que buscam por plataformas 3D de cultivo celular. Todavia, consideramos que esse foi o início do estudo da plataforma BNC-TS. Há gargalos ainda não resolvidos, como a necessidade de ampliação da escala produtiva de BNC, que permita maior produção de esferas e, portanto, disponibilize biomaterial para múltiplos desenhos experimentais. Para isso se faz necessário investigar e compreender os mecanismos moleculares envolvidos na síntese das esferas de nanocelulose bacteriana. Também é necessário submeter os cultivos celulares em BNC-TS a fármacos consagrados, de acordo com o mecanismo de interesse, de modo a reavaliar a expressão gênica. Dar sequência ao estudo do microambiente tumoral proporcionado pela BNC torna importante explorar o cocultivo com diferentes tipos celulares tanto no interior, quanto na superfície das BNC-TS.

Sugerimos cultivos que combinem células de sustentação não tumorais como os fibroblastos, e imunológicas como os macrófagos, para enriquecer as respostas alcançadas nesse microambiente tumoral e possibilitar traçar um paralelo com os modelos *in vivo*. Do mesmo modo, são necessários estudos sobre os mecanismos de invasão e morte celular que não foram abordados até aqui, assim como investigar a presença de células tronco tumorais. Ainda, avaliações histológicas da plataforma, cujo método não foi possível concluir, possibilitará caracterizar se há migração celular para camadas mais externas da plataforma esférica e o emprego de técnicas, como a citometria de fluxo, poderá avaliar o ciclo celular em cada um dos tempos de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ABEILLE, F. et al. Continuous microcarrier-based cell culture in a benchtop microfluidic bioreactor. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 18, p. 3510–3518, 2014.
- ADERHOLD, K. et al. Precision Medicine in the Treatment of Melanoma. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 1–13, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055320719300717>>.
- ALMUTAIRI, A. R. et al. Economic Evaluation of Talimogene Laherparepvec Plus Ipilimumab Combination Therapy vs Ipilimumab Monotherapy in Patients With Advanced Unresectable Melanoma. **JAMA Dermatology**, v. 155, n. 1, p. 22, 1 jan. 2019. Disponível em: <<http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamadermatol.2018.3958>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Melanoma Skin Cancer Stages. **ACS**, p. 1–4, 2019a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/melanoma-skin-cancer-stages.html>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment of Melanoma Skin Cancer, by Stage. **ACS**, p. 1–4, 2019b. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>>.
- ARNOLD, M. et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. **JAMA Dermatology**, v. 158, n. 5, p. 495, 1 maio 2022. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/fullarticle/2790344>>.
- AYDIN, Y. A.; AKSOY, N. D. Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1065–1075, 2014.
- BACAKOVA, L. et al. Versatile application of nanocellulose: From industry to skin tissue engineering and wound healing. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, 2019.
- BÄCKDAHL, H. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141–2149, mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205009993>>.
- BADEKILA, A. K.; KINI, S.; JAISWAL, A. K. Fabrication techniques of biomimetic scaffolds in three-dimensional cell culture: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 2, p. 741–762, 13 fev. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.29935>>.
- BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 13, p. 3015–3024, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jcs/article/doi/10.1242/jcs.079509/258092/Deconstructing-the-third-dimension-how-3D-culture>>.
- BARUD, H. S. et al. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochimica Acta**, v. 471, n. 1–2, p. 61–69, 2008.
- BEJARANO, L.; JORDÃO, M. J. C.; JOYCE, J. A. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. **Cancer Discovery**, v. 11, n. 4, p. 933–959, 1 abr. 2021. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/11/4/933/665833/Therapeutic-Targeting-of-the-Tumor>>.
- BERTI, F. V. Desenvolvimento de Estruturas Vasculares Endotelizadas em Scaffolds de Celulose Bacteriana. **Tese em Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 1–147, 2012.
- BERTI, F. V. et al. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials**

Science and Engineering: C, v. 33, n. 8, p. 4684–4691, dez. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113004323>>.

BI, J.-C. et al. Morphology and structure characterization of bacterial celluloses produced by different strains in agitated culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, p. 1305–1311, nov. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12619>>.

BOURLAND, J.; FRADETTE, J.; AUGER, F. A. Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13191, 4 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-31502-6>>.

BOUSSOMMIER-CALLEJA, A. In vitro models of cancer. In: **Bioengineering Innovative Solutions for Cancer**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 273–325.

BRANCATO, V. et al. Could 3D models of cancer enhance drug screening? **Biomaterials**, v. 232, n. July 2019, p. 119744, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119744>>.

BRANDES, R. et al. Influence of the Processing Parameters on the Characteristics of Spherical Bacterial Cellulose. **Fibers and Polymers**, v. 19, n. 2, p. 297–306, 1 fev. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12221-018-7679-5>>.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>>.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>>.

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 1–12, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039610919301239>>.

CARVALHO, M. R. et al. Evaluating Biomaterial- and Microfluidic-Based 3D Tumor Models. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 667–678, nov. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016777991500195X>>.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, L. L. et al. Desmoplastic melanoma: A review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 5, p. 825–833, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962212011772>>.

CHOPRA, A.; SHARMA, R.; RAO, U. N. M. Pathology of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 43–59, 2020.

CLARK, W. H. et al. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. **Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 705–727, 1969.

CORTESI, M.; GIORDANO, E. Non-destructive monitoring of 3D cell cultures: new technologies and applications. **PeerJ**, v. 10, p. e13338, 12 maio 2022. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/13338>>.

CORZO SALINAS, D. R. et al. Production of bacterial cellulose tubes for biomedical applications: Analysis of the effect of fermentation time on selected properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, n. August, p. 1–10, out. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021016706>>.

COURTENAY, J. C. et al. Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. **Cellulose**, v. 24, n. 1, p.

253–267, 2017.

CURVELLO, R.; RAGHUWANSHI, V. S.; GARNIER, G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 267, p. 47–61, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.002>>.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. malcolm. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3/4, p. 403–411, set. 2004.

DE SOUZA, S. S. BIONANOCELLULOSE: NEW METHODS FOR BIOFILM PRODUCTION AND HIGH-QUALITY BACTERIAL RNA EXTRACTION. **Thesis in Chemical Engineering - Federal University of Santa Catarina**, p. 1–156, 2017.

DE SOUZA, S. S. et al. Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1641–1655, 2019.

DEPERALTA, D. K.; BOLAND, G. M. Melanoma: Advances in Targeted Therapy and Molecular Markers. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 11, p. 3451–3458, 2015.

EBATA, T.; HIRATA, H.; KAWAUCHI, K. Functions of the Tumor Suppressors p53 and Rb in Actin Cytoskeleton Remodeling. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/9231057/>>.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, 2014.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models - Advances and prospects. **Acta Biomaterialia**, v. 75, p. 11–34, 2018.

FONG, E. L. S. et al. Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. **Biomaterials**, v. 108, p. 197–213, 2016.

FONTOURA, J. C. et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Materials Science and Engineering C**, v. 107, n. October 2019, p. 110264, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110264>>.

FRICKER, J. Time for reform in the drug-development process. **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 12, p. 1125–1126, dez. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204508702973>>.

FRIEDMAN, R. J.; RIGEL, D. S.; KOPF, A. W. Early Detection of Malignant Melanoma: The Role of Physician Examination and Self-Examination of the Skin. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 35, n. 3, p. 130–151, 1 maio 1985. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4471-3044-4_5>.

GALL, T. M. H.; FRAMPTON, A. E. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 11, p. 928–932, 2013.

GARUTTI, M. et al. Cdk4/6 inhibitors in melanoma: A comprehensive review. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2021.

GEORGE, J. et al. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 189–194, 2005.

GORRY, C.; MCCULLAGH, L.; BARRY, M. Economic Evaluation of Systemic Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Review. **Value in Health**, v. 23, n. 1, p. 52–60, 2020.

GU, J.; CATCHMARK, J. M. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 547–557, abr. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171101157X>>.

GUO, L. et al. Getting under the skin: The role of CDK4/6 in melanomas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 204, n. 17, p. 112531, out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112531>>.

GUY, G. P. et al. Melanoma Treatment Costs. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 43, n. 5, p. 537–545, 2012.

HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–1949, 2013.

HALIB, N. et al. The remarkable three-dimensional network structure of bacterial cellulose for tissue engineering applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, p. 631–640, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517319304612>>.

HAM, S. L. et al. Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 9, p. 939–954, 2016.

HEISTEIN, J. B.; ACHARYA, U. Cancer , Malignant Melanoma. **In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**, p. 1–6, 2020.

HENG, Y.-W.; KOH, C.-G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1622–1633, out. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.007>>.

HONEK, J. Preclinical research in drug development. **Medical Writing**, v. 26, n. 4, p. 5–8, 2017. Disponível em: <www.emwa.org>.

HONKALA, A. et al. Harnessing the predictive power of preclinical models for oncology drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 2, p. 99–114, 26 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41573-021-00301-6>>.

HOSHI, T. et al. Production of hollow-type spherical bacterial cellulose as a controlled release device by newly designed floating cultivation. **Heliyon**, v. 4, n. 10, 2018.

HU, Y. et al. Completely amorphous cellulose biosynthesized in agitated culture at low temperature. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 967–973, out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017349164>>.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M. Formation and Characterization of Spherelike Bacterial Cellulose Particles Produced by *Acetobacter xylinum* JCM 9730 Strain. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 7, p. 1727–1734, 12 jul. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm100060v>>.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M.; VOGLER, E. A. Factors Impacting the Formation of Sphere-Like Bacterial Cellulose Particles and Their Biocompatibility for Human Osteoblast Growth. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 10, p. 3444–3452, 14 out. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm400744a>>.

INCA. Monitoramento das ações de controle do cancer pele. p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/inform.deteccaoprecoce.pdf>>.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Melanoma of skin ASR. **Global Cancer Observatory**, p. 1–2, 2020. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_site.asp?selection=16120&title=Melanoma+of+skin&statistic=2&populationns=6&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=Execute>.

IZDEBSKA, M. et al. Involvement of Actin and Actin-Binding Proteins in Carcinogenesis. **Cells**, v. 9, n. 10, p.

2245, 6 out. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/10/2245>>.

JAYASUNDARA, K. et al. Estimating the clinical cost of drug development for orphan versus non-orphan drugs. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 14, n. 1, p. 12, 10 dez. 2019. Disponível em: <<https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-018-0990-4>>.

JOSHI, S. S.; HORNYAK, T. J. Cellular Phenotypic Plasticity of Cutaneous Melanoma: A Complex Puzzle. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 4, p. 743–745, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.025>>.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 30 maio 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200460587>>.

KLEMM, D. et al. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. **Materials Today**, v. 21, n. 7, p. 720–748, set. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702117307307>>.

KLICKS, J. et al. A novel spheroid-based co-culture model mimics loss of keratinocyte differentiation, melanoma cell invasion, and drug-induced selection of ABCB5-expressing cells. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 711–715, 2004.

KOVAC, B.; MÄKELÄ, T. P.; VALLENIUS, T. Increased α -actinin-1 destabilizes E-cadherin-based adhesions and associates with poor prognosis in basal-like breast cancer. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0196986, 9 maio 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0196986>>.

KULMS, D.; MEIER, F. In vitro models of melanoma. In: **Skin Tissue Models for Regenerative Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 57–75.

KUZMENKO, V. et al. Universal method for protein bioconjugation with nanocellulose scaffolds for increased cell adhesion. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4599–4607, dez. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113004347>>.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, p. 1–14, 2018.

LANGHANS, S. A. Using 3D in vitro cell culture models in anti-cancer drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 8, p. 841–850, 3 ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1912731>>.

LAROMAINE, A. et al. Free-standing three-dimensional hollow bacterial cellulose structures with controlled geometry via patterned superhydrophobic–hydrophilic surfaces. **Soft Matter**, v. 14, n. 19, p. 3955–3962, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8SM00112J>>.

LEENEMAN, B. et al. Healthcare Costs of Metastatic Cutaneous Melanoma in the Era of Immunotherapeutic and Targeted Drugs. **Cancers**, v. 12, n. 4, p. 1003, 18 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/12/4/1003>>.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

LI, J. et al. A Novel 3D in Vitro Tumor Model Based on Silk Fibroin/Chitosan Scaffolds to Mimic the Tumor Microenvironment. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 43, p. 36641–36651, 2018.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>>.
- LIVERANI, C. et al. A biomimetic 3D model of hypoxia-driven cancer progression. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- LUO, H. et al. Fabrication of a novel hierarchical fibrous scaffold for breast cancer cell culture. **Polymer Testing**, v. 80, n. July, p. 106107, dez. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941819311560>>.
- LV, D. et al. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. **Oncology Letters**, v. 14, n. 6, p. 6999–7010, 2017.
- MAK, I. W. Y.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. **American Journal of Translational Research**, v. 6, n. 2, p. 114–118, 2014.
- MARCONI, A. et al. Progress in melanoma modelling in vitro. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 578–586, 2018.
- MARTÍNEZ ÁVILA, H. et al. Novel bilayer bacterial nanocellulose scaffold supports neocartilage formation invitro and invivo. **Biomaterials**, v. 44, p. 122–133, 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Melanoma cutâneo Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas – Melanoma Cutâneo. 2022.
- MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 132–141, jun. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714001325>>.
- MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development**, v. 142, n. 4, p. 620–632, 15 fev. 2015. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.106567>>.
- MULLER, D. et al. Neuronal cells' behavior on polypyrrole coated bacterial nanocellulose three-dimensional (3D) scaffolds. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 24, n. 11, p. 1368–1377, 16 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09205063.2012.761058>>.
- NAKAMURA, Y.; FUJISAWA, Y. Diagnosis and Management of Acral Lentiginous Melanoma. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 19, n. 8, 2018.
- OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41–51, set. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715003161>>.
- OSORIO, M. et al. Development of novel three-dimensional scaffolds based on bacterial nanocellulose for tissue engineering and regenerative medicine: Effect of processing methods, pore size, and surface area. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 2, p. 348–359, fev. 2019a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.36532>>.
- OSORIO, M. et al. Novel surface modification of three-dimensional bacterial nanocellulose with cell-derived adhesion proteins for soft tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 100, n. August 2018, p. 697–705, jul. 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.045>>.
- OSORIO, M. et al. Biomimetics of microducts in three-dimensional bacterial nanocellulose biomaterials for soft tissue regenerative medicine. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5923–5937, 5 jul. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10570-020-03175-w>>.
- PA'E, N. et al. Thermal Behavior of Bacterial Cellulose-Based Hydrogels with Other Composites and Related

Instrumental Analysis. In: **Mondal M. (eds) Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series.** [s.l.: s.n.]p. 763–787.

PANG, M. et al. Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 122, p. 109365, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305719314582>>.

PARK, Y.; HUH, K. M.; KANG, S. W. Applications of biomaterials in 3d cell culture and contributions of 3d cell culture to drug development and basic biomedical research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–21, 2021.

PATTON, E. E. et al. Melanoma models for the next generation of therapies. **Cancer Cell**, v. 39, n. 5, p. 610–631, 2021.

PDQ CANCER GENETICS EDITORIAL BOARD. Genetics of Skin Cancer (PDQ®): Health Professional Version. **PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US)**, p. 1–106, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389333>>.

PICHETH, G. F. et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171>>.

POPA, L. et al. Bacterial Cellulose—A Remarkable Polymer as a Source for Biomaterials Tailoring. **Materials**, v. 15, n. 3, 2022.

PORTO, L. M. et al. Microarchitecture and radiological flow pattern of cocoon-like nanocellulose hydrogels. **Materials Research**, v. 22, n. 2, 2019.

POTIVARA, K.; PHISALAPHONG, M. Development and characterization of bacterial cellulose reinforced with natural rubber. **Materials**, v. 12, n. 14, 2019.

PRATHAPAN, R. et al. In Situ Alignment of Bacterial Cellulose Using Wrinkling. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 11, p. 7898–7907, 16 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsabm.0c01030>>.

QUINTANILLA-DIECK, M. J.; BICHAKJIAN, C. K. Management of Early-Stage Melanoma. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 35–42, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsc.2018.08.003>>.

R, R. et al. Bacterial nanocellulose: engineering, production, and applications. **Bioengineered**, v. 12, n. 2, p. 11463–11483, 20 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2009753>>.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005–1012, 2014.

RAVI, M. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, jan. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.24683>>.

REBECCA, V. W.; SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2020.

RECOUVREUX, D. O. S. et al. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 151–157, mar. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493110001852>>.

REIS, E. M. do. et al. Bacterial nanocellulose-IKVAV hydrogel matrix modulates melanoma tumor cell adhesion and proliferation and induces vasculogenic mimicry in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part**

B Applied Biomaterials, v. 106, n. 8, p. 2741–2749, 2018.

RIEDL, A. et al. Comparison of Cancer Cells in 2D vs 3D Culture Reveals Differences in AKT–MTOR–S6K Signaling and Drug Responses. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 203–218, 1 jan. 2017. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/content/joces/130/1/203.full.pdf>>.

RODRIGUES, J. et al. 3D In Vitro Model (R) evolution : Unveiling Tumor – Stroma Interactions. **Trends in Cancer**, v. 7, n. 3, p. 249–264, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.10.009>>.

RODRIGUES, T. et al. Emerging tumor spheroids technologies for 3D in vitro cancer modeling. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 184, p. 201–211, abr. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725817302681>>.

RYABAYA, O. et al. Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitor binimetinib in 2D and 3D models of human metastatic melanoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2548–2560, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218363261>>.

SALEH, A. K. et al. Statistical optimization and characterization of a biocellulose produced by local Egyptian isolate *Komagataeibacter hansenii* AS.5. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 198–207, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019332507>>.

SALVATIERRA, E. et al. SPARC Controls Melanoma Cell Plasticity through Rac1. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0134714, 6 ago. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0134714>>.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. April, p. 1–20, 2015.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.

SCHLANDER, M. et al. How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment. **Pharmacoeconomics**, v. 39, n. 11, p. 1243–1269, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40273-021-01065-y>>.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 2012.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, n. September 2018, p. 109963, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109963>>.

SHEPPARD, K. E.; MCARTHUR, G. A. The cell-cycle regulator CDK4: An emerging therapeutic target in melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5320–5328, 2013.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. v. 6, p. 813–823, 2006.

SIMEONI, R. B. et al. Beneficial Roles of Cellulose Patch-Mediated Cell Therapy in Myocardial Infarction: A Preclinical Study. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 424, 17 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/10/2/424>>.

SIMOENS, S.; HUYS, I. R&D Costs of New Medicines: A Landscape Analysis. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. October, p. 1–6, 26 out. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.760762/full>>.

SINGHSA, P.; NARAIN, R.; MANUSPIYA, H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. **Cellulose**, v. 25, n. 3, p. 1571–1581, 7 mar. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10570-018-1699-1>>.

SINHA, S.; VOHORA, D. Drug Discovery and Development. In: **Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 19–32.

SINITSKY, M. Y. et al. Modifications in routine protocol of RNA isolation can improve quality of RNA purified from adipocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 543, n. November 2017, p. 128–131, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269717305225>>.

SIONKOWSKA, A.; MEŻYKOWSKA, O.; PIĄTEK, J. Bacterial nanocelulose in biomedical applications: a review. **Polymer International**, v. 68, n. 11, p. 1841–1847, 2019.

SPEROTTO, G. et al. A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. **Cellulose**, v. 28, n. 5, p. 2649–2673, 2021.

STADLER, M. et al. Increased complexity in carcinomas: Analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 107–124, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.08.007>>.

STRICKLAND, L. R. et al. Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals. **Cancer Letters**, v. 359, n. 1, p. 20–35, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.016>>.

STUMPF, T. R. et al. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4739–4745, dez. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113004384>>.

SUN, S. F. et al. Enzymatic response of ryegrass cellulose and hemicellulose valorization introduced by sequential alkaline extractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-021-01921-1>>.

TONIATTI, C. et al. Oncology Drug Discovery: Planning a Turnaround. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 4, p. 397–404, 1 abr. 2014. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/4/4/397/4402/Oncology-Drug-Discovery-Planning-a-Turnaround>>.

TORRES, F. G.; ARROYO, J. J.; TRONCOSO, O. P. Bacterial cellulose nanocomposites: An all-nano type of material. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 1277–1293, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493118313237>>.

UGRIN, M. et al. Bacterial nanocellulose as a scaffold for in vitro cell migration assay. **Nanomaterials**, v. 11, n. 9, p. 1–11, 2021.

UL-ISLAM, M. et al. Development of three-dimensional bacterial cellulose/chitosan scaffolds: Analysis of cell-scaffold interaction for potential application in the diagnosis of ovarian cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 1050–1059, set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.050>>.

UNAL, S. et al. Glioblastoma cell adhesion properties through bacterial cellulose nanocrystals in polycaprolactone/gelatin electrospun nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, n. December 2019, p. 115820, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115820>>.

UNAL, S. et al. Production and characterization of bacterial cellulose scaffold and its modification with hyaluronic acid and gelatin for glioblastoma cell culture. **Cellulose**, v. 28, n. 1, p. 117–132, 24 jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-020-03528-5>>.

VADAYE KHEIRY, E. et al. The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with fisetin. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 9, p. 965–971, 2018.

VANSLEMBROUCK, B. et al. Microscopic Visualization of Cell-Cell Adhesion Complexes at Micro and Nanoscale. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, n. April, p. 1–27, 2022.

- VIELREICHER, M. et al. Bacterial nanocellulose stimulates mesenchymal stem cell expansion and formation of stable collagen-I networks as a novel biomaterial in tissue engineering. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma and the tumor microenvironment. **Current Oncology Reports**, v. 10, n. 5, p. 439–446, 2008.
- VÖRSMANN, H. et al. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 7, 2013.
- WANG, B. et al. Bacterial cellulose nanofiber reinforced poly(glycerol-sebacate) biomimetic matrix for 3D cell culture. **Cellulose**, v. 28, n. 13, p. 8483–8492, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-021-04053-9>>.
- WANG, J. et al. Novel Bacterial Cellulose/Gelatin Hydrogels as 3D Scaffolds for Tumor Cell Culture. **Polymers**, v. 10, n. 6, p. 581, 24 maio 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4360/10/6/581>>.
- WARD, W. H.; FARMA, J. M. (ed.). **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**. [s.l.] Codon Publications, 2017. v. 6
- WENZINA, J. et al. Inhibition of p38/MK2 Signaling Prevents Vascular Invasion of Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 4, p. 878- 890.e5, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X19332993>>.
- WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World cancer report 2020: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO, 2020.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Diet , nutrition , physical activity and skin cancerExpert Report**, 2018. . Disponível em: <dietandcancerreport.org>.
- WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA**, v. 323, n. 9, p. 844, 3 mar. 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762311>>.
- XIONG, G. et al. Creation of macropores in three-dimensional bacterial cellulose scaffold for potential cancer cell culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 553–557, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714008492>>.
- YANG, J. et al. The application of natural polymer–based hydrogels in tissue engineering. In: **Hydrogels Based on Natural Polymers**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 273–307.
- YU, J. et al. Production of Hollow Bacterial Cellulose Microspheres Using Microfluidics to Form an Injectable Porous Scaffold for Wound Healing. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 23, p. 2983–2992, dez. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/adhm.201600898>>.
- YUEN, J. D. et al. A Fully-Flexible Solution-Processed Autonomous Glucose Indicator. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19103, 11 maio 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep19103>>.
- ZANONI, M. et al. Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 289–301, 2019.
- ZENG, M.; LAROMAINE, A.; ROIG, A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4455–4469, 2014.

ZHU, H. et al. Preparation and Application of Bacterial Cellulose Sphere: A Novel Biomaterial. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 1, p. 2233–2236, 16 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.5504/BBEQ.2011.0010>>.

DataIntelo. (2020). Bacterial Nanocellulose Market Size, Growth, Analysis & Outlook | Research Report 2026 (Report ID: 76942). <https://dataintelo.com/report/bacterial-nanocellulose-market-report/>

INCA. Instituto Nacional de câncer. (2020). Síntese de resultados e comentários. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>