

Najla Adel Saleh

**CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL:  
DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA AVALIAÇÃO  
DA RELAÇÃO ENTRE O MICROAMBIENTE TUMORAL E A  
AÇÃO DE NOVOS AGENTES ANTITUMORAIS**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Branco Fillipin Monteiro

Florianópolis  
2017

Saleh, Najla Adel  
CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL: DESENVOLVIMENTO  
DE UM MODELO PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O  
MICROAMBIENTE TUMORAL E A AÇÃO DE NOVOS AGENTES  
ANTITUMORAIS / Najla Adel Saleh ; orientador, Tânia  
Beatriz Creczynski Pasa ; coorientador, Fabíola  
Branco Fillipin Monteiro. - Florianópolis, SC, 2017.  
112 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro  
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Melanoma. 3. Cultura celular  
tridimensional. 4. Co-cultura. 5. Sal de  
isotiocarbônio. I. Pasa, Tânia Beatriz Creczynski . II.  
Monteiro, Fabíola Branco Fillipin. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

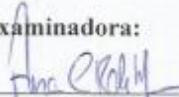
**“CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL:  
DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA  
AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O  
MICROAMBIENTE TUMORAL E A AÇÃO DE  
NOVOS AGENTES ANTITUMORAIS”**

**POR**

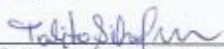
**Najla Adel Saleh**

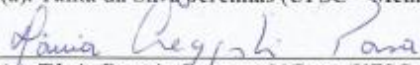
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Ana Carolina Rabello de Moraes (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Evelyn Winter da Silva (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Talita da Silva Jeremias (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientador(a))

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2017.



Dedico este trabalho as pessoas que estão lutando contra algum tipo de tumor, especialmente as crianças. O que faço é apenas uma gota dentro do vasto oceano, mas espero que um dia este vasto oceano contendo minha gota possa chegar a vocês.



## AGRADECIMENTOS

Como credora de Deus, agradeço primeiramente a Ele por ter me dado a dádiva do viver.

À Universidade Federal de Santa Catarina juntamente ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade da vaga e da bolsa concedida.

À minha orientadora Tânia Beatriz Creczynski Pasa por me ceder espaço (em seu laboratório e coração) para pesquisar e atuar na área que gosto, também por toda sua experiência e conhecimento, os quais foram repassados a mim na forma de ensinamentos, correções e incentivos.

Agradeço também a minha dedicada co-orientadora Fabíola Branco Fillipin Monteiro, por toda a paciência e prestatividade ao sanar minhas dúvidas. Um grande exemplo de pesquisadora a ser seguido.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas, especialmente ao meu “anjinho” Michele Rode, sou muito grata por todo o auxílio e conselhos que me deu. Tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo que realmente sabe fazer um grande e belo trabalho em equipe.

A todos os professores e demais profissionais da área de educação e pesquisa (corpo técnico e afins) que passaram em minha vida e contribuíram para minha formação, carregando comigo um pouco da sabedoria de cada um de vocês.

À minha base de tudo, família. Meus pais, Adel e Zarah que são minha grande inspiração. Sou o que sou por causa de vocês, muito obrigada! Minha irmã Halime, minha “bãzinha” que sempre esteve comigo em tudo me apoiando e às vezes criticando, a melhor amiga da minha vida, juntas somos uma só! Minha vó, tia e tios que também contribuíram com muito amor e ensinamentos. Amo muito vocês!

Ao grande amor da minha vida, meu noivo Cleiton Oliveira que sempre teve muita calma, atenção e respeito comigo. Que em todas as horas esteve ao meu lado com o olhar, gestos e palavras certas. Obrigada pelo imenso carinho meu habibe. Te amo!

Aos meus amigos de infância que cultivo até hoje, e aos que venho adquirindo ao longo do passar. Obrigada por todo o apoio e por compartilharem comigo momentos prazerosos de muitas alegrias. Amo vocês.





“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida, a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin (1889 – 1977)



## RESUMO

O melanoma é o mais grave tipo de câncer de pele pela possibilidade de metástase e desde 1975, a dacarbazina continua a ser o tratamento padrão, mesmo apresentando muitas reações adversas. O número de candidatos a agentes antitumorais vem crescendo a cada ano, porém a falta de modelos *in vitro* representativos de um microambiente tumoral não acompanha este crescimento. A cultura tridimensional (3D) se mostra um dos melhores modelos *in vitro* para mimetizar o microambiente tumoral. Neste trabalho, utilizando a estratégia de formação de esferoide, desenvolveu-se um modelo celular 3D de melanoma murino isolado ou associado a macrófagos e fibroblastos. Para o melanoma, um modelo assim ainda não foi descrito na literatura. Dentre as tentativas, o modelo foi padronizado utilizando gel de agarose 2% como base e uma densidade celular de  $1,2 \times 10^4$ /poço para a formação dos esferoides. Os esferoides formados apresentaram tamanho médio de 300  $\mu\text{m}$  compatível com a literatura. Além disso, o heteroesferoide composto pelas três linhagens celulares (melanoma, macrófagos e fibroblastos) mostrou-se mais rígido e estável aparentemente, em comparação com as outras condições testadas, características estas provavelmente provenientes da alta produção de matriz extracelular. Os esferoides supostamente demonstraram a formação de duas zonas: uma periférica de células viáveis e outra interna de células necróticas, que foram confirmadas pela contagem de células, a qual diminuiu no sétimo dia em relação ao quarto dia de cultivo 3D e pela presença de grandes espaços vazios no interior dos esferoides, observados pela microscopia. O perfil inflamatório dos macrófagos presentes nos esferoides foi induzido usando lipolissacarídeo (LPS) para polarização M1 e dexametasona (DEX) para polarização M2. Após caracterização dos esferoides, estes foram incubados com o sal de isotiourônio MF03 e a dacarbazina. Os resultados revelaram que o sal de isotiourônio MF03 mostrou-se mais citotóxico que a dacarbazina no modelo 3D de melanoma. Adicionalmente, observou-se diferenças importantes em termos de citotoxicidade das moléculas, comparando-se o modelo bidimensional (2D) com o 3D. Diante dos resultados, conclui-se que foi desenvolvido um modelo 3D de melanoma adequado para a triagem de possíveis agentes antitumorais, sendo que o sal de isotiourônio MF03 mostrou-se promissor para o tratamento antitumoral de melanoma.

**Palavras-chave:** Melanoma, microambiente tumoral, co-cultura celular, cultura celular 3D, sais de isotiourônio.



## ABSTRACT

Melanomas is the most severe type of skin cancer, and since 1975, dacarbazine remains the standard treatment for most patients, even presenting many adverse reactions. The number of candidates to antitumor agents is increasing every year, although the lack of in vitro models to represent the tumor microenvironment disrupts the process. Three-dimensional (3D) culture is one the best in vitro models to mimic the tumor microenvironment. In this work, using spheroid strategies, a 3D murine melanoma cellular model isolated or associated with macrophages and fibroblasts was developed. Melanoma model has not been described previously. Among the attempts the model was standardized using agarose gel 2 % and a cell density of  $1,2 \times 10^4$ /well to spheroid formation. Spheroids size was around 300  $\mu\text{m}$ , as described in the literature. In addition, heterospheroids composed of three cell lines (melanoma, macrophages and fibroblasts) showed more rigid and stable apparently when compared with other tried conditions, probably due to high extracellular matrix production. Spheroids supposedly showed two different regions: a peripheral zone containing viable cells and an internal zone containing necrotic cells which was demonstrated by the decrease in the number of cells on the seventh day when compared with the day four, and by presence of large empty spaces inside the spheroids, visualized by microscopy. The inflammatory profile associated with the macrophages-containing spheroids was induced using lipopolysaccharide (LPS) to M1 polarization and dexamethasone to M2 polarization. Following the characterization, spheroids were incubated with MF03 isothiuronium salt and dacarbazine. The results showed that MF03 was most cytotoxic than dacarbazine using the 3D melanoma model. Additionally, it was observed significant cytotoxic differences between bidimensional (2D) and 3D models. In conclusion, we developed a 3D melanoma model to improve the screening of new antitumor agents as well as the promising application of MF03 as a new anti-melanoma.

**Keywords:** Melanoma, tumor microenvironment, cellular co-culture, 3D cellular culture, isothiuronium salts.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O microambiente tumoral.....	30
Figura 2 – Nichos do microambiente tumoral.....	31
Figura 3- Polarização macrofágica.....	34
Figura 4 – Ativação de fibroblastos associados ao câncer.....	37
Figura 5 – Metodologias para a formação de esferoides.....	41
Figura 6 – Regiões de um esferoide.....	42
Figura 7 – Principais células envolvidas no câncer de pele.....	43
Figura 8 – Características visuais do melanoma maligno (ABCDE dos sinais) .....	45
Figura 9 – Esquema do desenho experimenta.....	51
Figura 10 – Padronização do protocolo de formação dos esferoides.....	54
Figura 11 – Tentativas de polarização dos macrófagos.....	59
Figura 12 – Estrutura do sal de isotiourônio MF03.....	61
Figura 13 – Incubação dos esferoides com o sal de isotiourônio MF03 e dacarbazina.....	62
Figura 14 – Tentativas de formação de esferoides em diferentes concentrações de agarose.....	64
Figura 15 – Tentativas de formação de esferoides em diferentes densidades celulares.....	65
Figura 16 – Monocultura de macrófagos (J774).....	66

Figura 17 – Fotomicrografia representativa dos esferoides formados nas diferentes condições de cultura 3D no quarto e sétimo dia de cultivo.....	67
Figura 18 – Diâmetro dos esferoides nas diferentes condições de cultura 3D no quarto e sétimo dia de cultivo.....	68
Figura 19 – Crescimento dos esferoides nas diferentes condições de cultura 3D no sétimo dia de cultivo.....	70
Figura 20 – Número e viabilidade celular dos esferoides no quarto e sétimo dia de cultivo 3D.....	72
Figura 21 – Viabilidade celular dos esferoides no sétimo dia de cultivo 3D.....	74
Figura 22 – Análise morfológica dos esferoides por microscopia eletrônica de varredura.....	76
Figura 23 – Análise morfológica dos esferoides por microscopia de fluorescência.....	77
Figura 24 – Análise morfológica dos esferoides por HE.....	78
Figura 25 – Tabela 5 – Determinação de $\cdot\text{NO}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que possuíam macrófagos.....	80
Figura 26 – Tabela 5 – Determinação de $\cdot\text{NO}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que não possuíam macrófagos.....	81
Figura 27 – Fotomicrografia representativa dos esferoides após incubação com dacarbazina e MF03.....	86
Figura 28 – Diâmetro dos esferoides após incubação com dacarbazina e MF03.....	87
Figura 29 – Viabilidade celular por citometria de fluxo: Iodeto de própídeo (IP).....	109



Figura 30 – Curvas analíticas <sup>15</sup> NO e IL-6.....	110
Figura 31 – Curvas de concentração – resposta das condições 3D com dacarbazina e MF03.....	111
Figura 32 - Curvas de concentração – resposta da condição 2D de monocultura com B16F10 com dacarbazina e MF03.....	112



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Classificação dos tumores sólidos.....	29
Quadro 2 – Metodologias para formação de esferoides.....	40
Quadro 3 – Lista de reagentes.....	52



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diâmetro dos esferoides nas diferentes condições de cultura 3D no quarto e sétimo dia de cultivo.....	69
Tabela 2 – Crescimento dos esferoides nas diferentes condições de cultivo 3D.....	70
Tabela 3 – Número e viabilidade celular no quarto dia de cultivo 3D.....	73
Tabela 4 – Viabilidade celular dos esferoides no sétimo dia de cultivo 3D.....	74
Tabela 5 – Determinação de $\cdot\text{NO}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que possuíam macrófagos.....	80
Tabela 6 – Determinação de $\cdot\text{NO}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que não possuíam macrófagos.....	82
Tabela 7 – Determinação de IL-6, após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que possuíam macrófagos.....	83
Tabela 8 – $\text{CC}_{50}$ nas condições 3D.....	84
Tabela 9 – Comparação da $\text{CC}_{50}$ das culturas 2D e 3D na linhagem de melanoma.....	85
Tabela 10 – Diâmetro dos esferoides após incubação com dacarbazina e MF03.....	88



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ANOVA	Análise de variância
APH	<i>Acid phosphatase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Arg-1	Arginase-1
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica do composto que causa 50% da morte celular
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DEX	Dexametasona
DMEM	<i>Dulbecco modified eagles's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACs	Fibroblastos associados ao câncer
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HMDS	Hexametildisilazano
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP	Iodeto de propídio
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
MATs	Macrófagos associados ao tumor
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio

ND	Não detectável
NED	N-(1-naftil) etilenodiamina
$\cdot$ NO	<i>Nitric Oxide</i>
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
SBF	Soro bovino fetal
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1 TUMORES SÓLIDOS .....	29
2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL .....	30
2.3 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR (MATs) .....	33
2.4 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER (FACs) .....	36
2.5 CULTURA TRIDIMENSIONAL (3D) .....	38
2.6 MELANOMA .....	42
2.7 SAIS DE ISOTIOURÔNIO .....	47
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>51</b>
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	51
4.2 REAGENTES .....	51
4.3 CULTURA CELULAR .....	52
4.4 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D) .....	53
<b>4.4.1 Cultura 3D</b> .....	<b>53</b>
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D .....	55
<b>4.5.1 Tamanho dos esferoides</b> .....	<b>55</b>
<b>4.5.2 Quantificação celular</b> .....	<b>55</b>
<b>4.5.3 Viabilidade celular</b> .....	<b>56</b>
<b>4.5.4 Morfologia celular</b> .....	<b>56</b>
4.5.4.1 Morfologia celular externa dos esferoides .....	56
4.5.4.2 Morfologia celular interna dos esferoides .....	57
<b>4.5.5 Perfil inflamatório</b> .....	<b>58</b>
4.5.5.1 Perfil de liberação de óxido nítrico (·NO) .....	59
4.5.5.2 Perfil de liberação de citocina Interleucina-6 (IL-6) .....	60

4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CULTURA 3D COM O SAL DE ISOTIOURÔNIO MF03 .....	60
<b>4.6.1 Síntese do composto orgânico .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6.2 Determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) .....</b>	<b>61</b>
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D) .....	63
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D	66
<b>5.2.1 Estrutura e tamanho dos esferoides .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2.2 Número e viabilidade celular dos esferoides.....</b>	<b>70</b>
<b>5.2.3 Morfologia celular .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.4 Perfil inflamatório .....</b>	<b>79</b>
5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CULTURA 3D COM O SAL DE ISOTIOURÔNIO MF03 .....	83
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE A – Viabilidade celular .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE B – Curvas analíticas <math>\gamma</math>NO e IL-6.....</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE C – Curvas de concentração – resposta dacarbazina e MF03 .....</b>	<b>111</b>
<b>APÊNDICE D – Curvas de concentração – resposta dacarbazina e MF03 em cultura 2D.....</b>	<b>112</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra câncer é um termo genérico para um grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo. O câncer é definido pelo crescimento anormal e descontrolado de células que podem invadir e espalhar-se para outros órgãos do corpo que não o de sua origem, processo este conhecido como metástase. Estima-se que aproximadamente 8,2 milhões de pessoas no mundo morrem por ano devido ao câncer, e em torno de 80 % deste valor é decorrente de tumores sólidos (WHO, 2016). No Brasil, a estimativa para 2016-2017 é de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2017a).

Os tumores sólidos são considerados estruturas heterogêneas e complexas, altamente organizados, frequentemente citados como agressivos pela capacidade de gerar metástases, resistência e/ou recidiva ao tratamento antitumoral, capacidade esta que provém do microambiente tumoral (TREDAN et al., 2007)

A comunicação entre a célula e seu microambiente regula vários processos fisiológicos, como diferenciação e proliferação celular, expressão de vários genes, migração celular em metástases tumorais e transformação em fenótipos malignos. Estas micro condições ambientais são essenciais na regulação da iniciação e progressão tumoral (TALUKDAR et al., 2011).

Para melhor simulação *in vitro* do microambiente tumoral, a cocultura tridimensional (3D) é indicada. Modelos 3D *in vitro* são mais representativos em relação aos mecanismos moleculares e celulares, facilitando o desenvolvimento e a triagem de novas terapias antitumorais, pois recriam a arquitetura do tecido tumoral bem como sua heterogeneidade celular (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; ZIETARSKA et al., 2007).

Entre os tumores sólidos, destaca-se neste trabalho o melanoma, que é um tipo de câncer de pele com mau prognóstico, pois é um dos mais comuns entre os cânceres metastáticos, e por este motivo é conhecido pelo nome de melanoma maligno (CHIN; GARRAWAY; FISHER, 2006). A taxa de sobrevida em 10 anos de pacientes com melanoma maligno é de apenas 10 % para estágios avançados da doença (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009).

A taxa de sobrevida baixa reflete a ausência de tratamentos consistentemente benéficos para o melanoma maligno. São necessários modelos de pesquisa aperfeiçoados para investigar os mecanismos biológicos subjacentes que medeiam a invasão tumoral e as metástases subsequentes, a fim de facilitar o desenvolvimento de terapias

direcionadas mais efetivas, melhorando assim o resultado clínico (SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011).

Segundo Cisilotto e colaboradores (2015), o composto sintético sal de isotiourônio denominado MF03 foi um dos mais citotóxicos, entre uma série de compostos testados em linhagens celulares de melanoma, provocando alterações morfológicas nas células, diminuição da proliferação celular e interferência na migração e invasão celular, bem como a diminuição da expressão do oncogene N-RAS, um importante gene relacionado com a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular.

Diante desta problemática, neste trabalho foi caracterizado e validado um modelo de cultura 3D tumoral a fim de relacionar a influência do estroma proveniente do microambiente tumoral na avaliação da atividade antitumoral do sal de isotiourônio MF03, buscando contribuir para o conhecimento sobre os possíveis mecanismos de interferência do microambiente tumoral na pesquisa referente a ação antitumoral de novos fármacos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TUMORES SÓLIDOS

Os tumores sólidos, são caracterizados pelo crescimento anormal de células em um tecido, formando uma “massa” tumoral. A classificação tem sido realizada de acordo com o tecido primário acometido, sendo que tumores epiteliais e glandulares (carcinomas) possuem taxas de incidência maiores que os sarcomas e linfomas como ilustrado no Quadro 1 (RAVI; SHRUTI; MADHUMITHA, 2012).

Quadro 1 – Classificação dos tumores sólidos

<b>Tipo de tumor sólido</b>	Sarcoma	Linfoma	Carcinoma
<b>Incidência mundial (%)</b>	4	15	81
<b>Tecido de origem</b>	Muscular e ósseo	Órgãos linfóides	Epitelial e Glandular

Fonte: adaptado de Ravi; Shruti; Madhumitha (2012)

Entre os carcinomas com maior incidência no Brasil, destacam-se: o câncer de mama, próstata, traqueia, brônquio e pulmão, cólon e reto, colo do útero, estômago, cavidade oral, esôfago, corpo do útero, bexiga, ovário, tireoide e laringe (INCA, 2017a).

O diagnóstico e a terapêutica dos tumores sólidos têm evoluído com o passar do tempo e são provavelmente as áreas em desenvolvimento mais rápidas em investigação. Estas constantes melhorias auxiliam na compreensão da fisiologia dos tumores sólidos (RAVI; SHRUTI; MADHUMITHA, 2012).

A organização das células dentro de tumores sólidos é heterogênea e complexa e é utilizada como base para o diagnóstico patológico do câncer. No entanto, as variações das características de crescimento entre células em regiões com e sem vascularização têm sido investigada, pois diferem-se (CARLSSON; YUHAS, 1984).

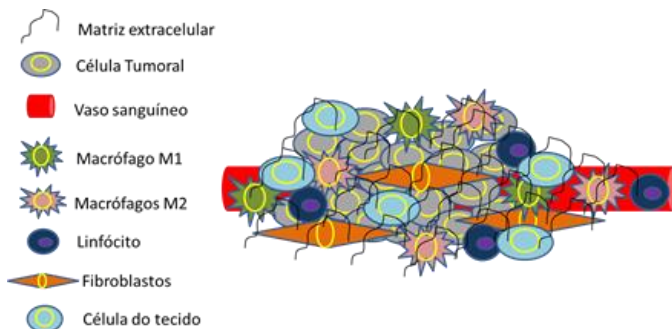
Os tumores sólidos são constituídos por dois componentes: um tumoral, caracterizado pelas células tumorais, e outro estromal (TREDAN et al., 2007). O componente estromal consiste basicamente de células não tumorais (células não tumorais do próprio tecido; células do sistema imune: macrófagos, neutrófilos e linfócitos; fibroblastos e células endoteliais), da matriz extracelular (colágeno, elastina,

fibronectina, laminina e proteoglicanos) (CHOI et al., 2013), vasos sanguíneos e linfáticos, e nervos. Todos estes componentes, celulares ou não, formam o microambiente tumoral (MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

## 2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral é caracterizado pelas interações entre células tumorais e os diferentes componentes do estroma (célula tumoral ↔ estroma; estroma ↔ estroma; célula tumoral ↔ célula tumoral) (Figura 1). Estas interações geram sinalizações necessárias para a ativação de fatores de transcrição que induzem a expressão de genes que promovem a proliferação e migração celular. A comunicação intercelular é coordenada pela complexa e dinâmica ação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas (MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

Figura 1 – O microambiente tumoral



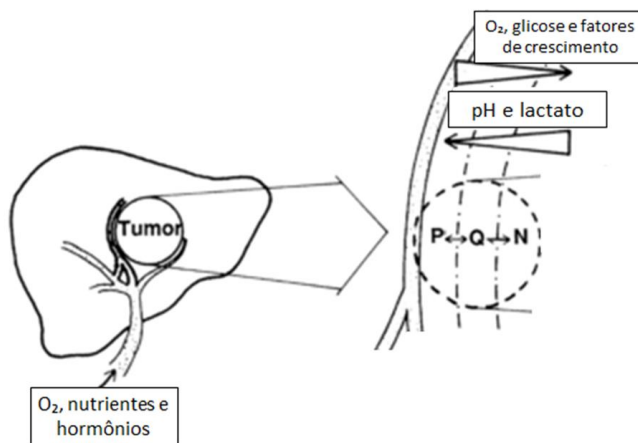
O microambiente tumoral é composto pelas células tumorais e outros elementos que formam o estroma, como as células não tumorais e a matriz extracelular. Fonte: elaborado pela autora.

O microambiente tumoral não é composto apenas de componentes celulares, mas também de substâncias bioativas, incluindo hormônios, componentes de matriz extracelular, quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. Além disso, sabe-se que a composição e as características do microambiente tumoral variam dependendo do local do tumor (WU et al., 2012).

No microambiente tumoral há nichos, nos quais ocorrem grandes diferenças de gradientes de concentrações de metabólitos críticos, como

oxigênio ( $O_2$ ), glicose, lactato e íons  $H^+$ , além de muitos outros nutrientes, hormônios e fatores de crescimento (Figura 2). A deficiência de vascularização pode ser evidente em áreas de necrose nos tumores metastáticos, assim sugere-se que a distribuição intratumoral de substratos importantes, como glicose ou outros nutrientes, bem como fatores de crescimento, pode ser deficiente e/ou heterogênea (LEE et al., 2013). As células tumorais utilizam a glicólise (conversão da glicose em lactato para produção de adenosina trifosfato - ATP) para obter a energia de que necessitam para sobreviver e proliferar, com a falta de glicose no interior do tumor, as células não proliferam e morrem. Além disso, a diminuição da depuração de produtos ácidos do metabolismo oxidativo leva a uma diminuição do pH intersticial, principalmente no interior do tumor, contribuindo também para a necrose celular (TREDAN et al., 2007).

Figura 2 – Nichos do microambiente tumoral



Diferentes gradientes de concentrações de metabólitos críticos no microambiente tumoral - influência direta na proliferação e sobrevivência das células tumorais. Legenda: P = células proliferativas; Q = células quiescentes; N = células necróticas.

Fonte: adaptado de Sutherland (1988).

O crescimento tumoral é caracterizado por uma fase de proliferação exponencial de células seguida por uma fase de declínio da taxa de crescimento associada a um aumento na quantidade de células não proliferativas ou quiescentes, além de células necróticas. As células

em proliferação estão normalmente localizadas próximas aos vasos sanguíneos funcionais. As células tumorais malignas recrutam células endoteliais provenientes do estroma através da produção e secreção de fatores de crescimento e citocinas para a formação de novos vasos, caracterizando a angiogênese. A angiogênese no microambiente tumoral ocorre de forma heterogênea e desorganizada, propiciando a presença de células quiescentes e necróticas (HANAHAN; COUSSENS, 2012).

As células quiescentes e necróticas estão mais distantes dos vasos (SUTHERLAND, 1988), pois a privação de nutrientes induz a parada do ciclo celular e a taxa de proliferação das células tumorais diminui como consequência. Se as células próximas aos vasos sanguíneos são mortas por algum tipo de tratamento, por exemplo, o suprimento de nutrientes para as células previamente hipóxicas pode melhorar, possibilitando a sobrevivência dessas células e a recidiva do tumor (TREDAN et al., 2007).

Além da vascularização, a matriz extracelular também pode variar muito entre os tumores, tanto em quantidade como na composição (TREDAN et al., 2007). Além disso, a composição da matriz pode ser totalmente diferente de uma situação normal. Os principais componentes em excesso são o colágeno, fibronectina e proteoglicanos, resultando na diminuição da penetração de agentes terapêuticos (CHOI et al., 2013). A ativação de células estromais pode causar modificações da matriz extracelular adjacente favorecendo à microinvasão de células tumorais, pois o remodelamento da matriz extracelular é um passo necessário na invasão celular local (LIOTTA; KOHN, 2001).

O microambiente tumoral fornece os sinais necessários para a ativação de fatores de transcrição que permitem as células tumorais migrarem invadindo tecidos distantes e estabelecendo um novo ambiente tumoral. As próprias células tumorais secretam diretamente uma variedade de proteínas que incluem fatores de crescimento e proteinases que degradam a matriz extracelular. As proteínas produzidas pelas células tumorais no microambiente estão também envolvidas na adesão celular, motilidade celular, comunicação intercelular e invasão tecidual (MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

Dentre as principais células do estroma presentes no microambiente tumoral, destacam-se os macrófagos e os fibroblastos, por serem células presentes em abundância neste local, as quais interagem com as células tumorais liberando substâncias anti- ou pró-inflamatórias e na maioria das vezes pró-tumorais (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012).



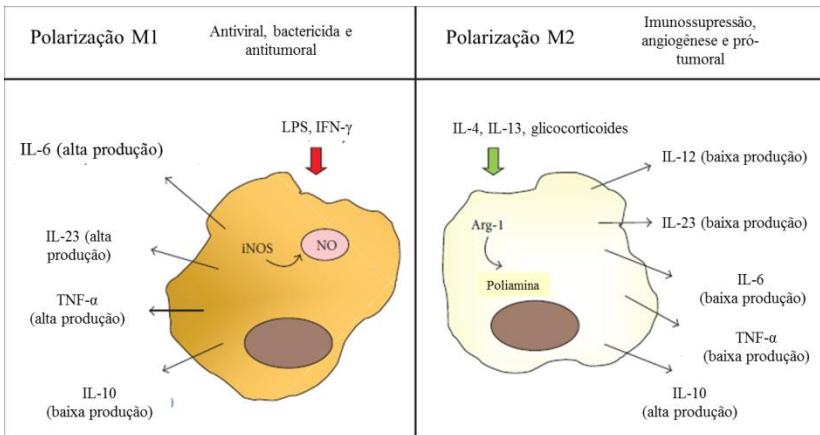
### 2.3 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR (MATs)

Os macrófagos são considerados células de defesa e tem origem na medula óssea a partir de um progenitor mieloide, que dá origem aos monócitos, encontrados na corrente sanguínea. Os monócitos compreendem de 3 a 7 % dos leucócitos na corrente sanguínea (HUSSEIN, 2006). Ao entrar em algum tecido específico, os monócitos se diferenciam em macrófagos, e dependendo do tecido expressam um fenótipo específico. Nos tecidos seus nomes diferem: células de Kupffer no fígado, Langherans na pele, micróglia no cérebro e macrófagos associados ao tumor (MATs) nos tumores sólidos (LEWIS; POLLARD, 2006).

A atuação dos macrófagos está relacionada fundamentalmente a fagocitose, pois consistem em células que possuem grânulos, os quais contêm enzimas hidrolíticas (HUSSEIN, 2006). Entre os leucócitos, são as células em maior abundância no microambiente tumoral (MANTOVANI et al., 2002), podendo constituir em até 50 % do tumor. Podem ser diretamente citotóxicos as células tumorais ou suprimir outras funções imunitárias por citocinas liberadas no microambiente tumoral (SUTHERLAND, 1988).

Os MATs geralmente são monócitos recrutados da corrente sanguínea por quimiocinas liberadas pelo tecido tumoral e podem ser identificados em dois estados distintos de ativação: os macrófagos classicamente ativados (M1) e os macrófagos alternativamente ativados (M2) (Figura 3) (GEISSMANN et al., 2010). Assim, dependendo do estímulo, os macrófagos podem diferenciar-se em M1 ou M2.

Figura 3 – Polarização macrofágica



A polarização M1 é estimulada por LPS e IFN- $\gamma$ , secretando citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e NO. A polarização M2 é estimulada por IL-4, IL-13 e glicocorticoides, secretando citocinas anti-inflamatórias como IL-10. Legenda: LPS = lipopolissacarídeo; IFN- $\gamma$  = interferon-gama; IL = interleucina; iNOS = óxido nítrico sintase induzível; NO = óxido nítrico; TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral – alfa; Arg-1= arginase – 1.

Fonte: adaptado de Través; Luque; Hortelano (2012).

Na presença de produtos microbianos como lipolissacarídeo (LPS) ou citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), os macrófagos polarizam-se em M1 expressando atividades antiviral, bactericida e antitumoral por produzirem altas quantidades de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativarem a resposta imune (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Além disso, macrófagos M1 liberam metaloproteínas capazes de remodelar o tecido (GEISSMANN et al., 2010). A presença de macrófagos polarizados em M1 nos tumores agressivos deve ser considerada ocasional, pois geralmente macrófagos M1 estão relacionados com um bom prognóstico (COMITO et al., 2013). Macrófagos M1 também produzem altas concentrações de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), por indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*), além disso possuem alta produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-6, IL-23 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor -  $\alpha$* ),

bem como a diminuição da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (MANTOVANI et al., 2002).

Por outro lado, os macrófagos M2 promovem reparo tecidual, angiogênese e favorecem a progressão tumoral. São ativados por citocinas anti-inflamatórias como IL-13 e IL-4 e também por glicocorticoides (SOLINAS et al., 2009). A polarização M2 geralmente ocorre no contato com os fibroblastos, ou com as células tumorais (COMITO et al., 2013) e apresentam um fenótipo de produção de IL-10 alto, e IL-12, -6 e -23 baixos, além da expressão do receptor de manose. Os macrófagos M2 apresentam alta produção de ornitina e poliaminas pela ativação da enzima arginase-1 (Arg-1) (MANTOVANI et al., 2002) que são precursores para a síntese de colágeno e proliferação celular (TRAVÉS; LUQUE; HORTELANO, 2012). Macrófagos M2 também estão associados ao remodelamento da matriz extracelular e a expressão de altas quantidades de algumas proteínas da matriz como a fibronectina (GRATCHEV et al., 2001).

Geralmente, MATs possuem fenótipo semelhante a M2 (MANTOVANI et al., 2002). Há evidências pré-clínicas e clínicas de que a abundância de MATs está associada com mau prognóstico (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012). No estudo de Bögers et al. (2012), foi proposto que as células cancerígenas de carcinoma de cólon secretam fatores no microambiente tumoral que tornam os monócitos mais propensos a polarização em macrófagos M1, associando-se ao bom prognóstico. Pelo contrário, as células de carcinoma da mama liberam fatores que inibem a polarização de macrófagos antitumorais, aumentando a polarização de M2 e a associação ao mau prognóstico desta doença. Também é conhecido que macrófagos M1 no microambiente tumoral podem alterar o fenótipo para M2 em resposta às citocinas, como IL-4, IL-10 e IL-13, liberadas pelas células tumorais (MOVAHEDI et al., 2010). Além do carcinoma de mama, são encontradas correlações entre MATs e mau prognóstico nos carcinomas hepatocelulares, de próstata e melanoma maligno (TRAVÉS; LUQUE; HORTELANO, 2012).

Os MATs também são os principais contribuintes para a angiogênese tumoral. A interação bidirecional entre macrófagos e o microambiente tumoral molda o fenótipo em resposta às condições ambientais. A hipóxia tumoral é importante, pois muitos MATs acumulam-se em áreas necróticas. É consenso que estas áreas atraem MATs por liberarem quimiocinas induzidas pela hipóxia, tais como factor de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e endotelinas (BALKWILL; CAPASSO;

HAGEMANN, 2012). Os MATs também produzem enzimas e inibidores que regulam a degradação da matriz extracelular como as metaloproteinases, plasmina e plasminogênio (MANTOVANI et al., 2002).

A diferenciação dos fenótipos M1 e M2 ocorre por marcadores distintos na superfície da membrana celular (como CD40, CD64, CXCL11 e CCR7 para M1 e MR, estabilina-1, CD180, CD180, CD163 e TREM2 para M2) bem como concentrações altas ou baixas das citocinas pró e anti-inflamatórias (como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10) produzidas por cada fenótipo como mostrado na Figura 3 (VOGEL et al., 2014).

## 2.4 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER (FACs)

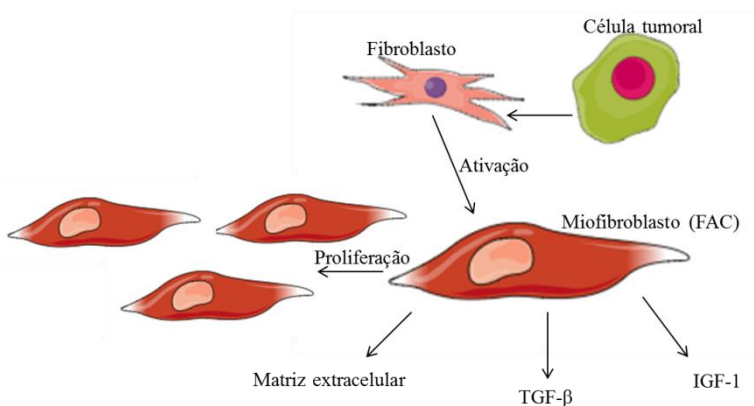
Os fibroblastos são células encontradas em todos os tecidos atuando na formação e remodelação dos tecidos. Eles possuem a capacidade de, quando ativos, definir a estrutura do microambiente tecidual e modular o comportamento das células imunológicas e das citocinas, de modo que a cinética e a natureza do infiltrado inflamatório sejam apropriadas para a causa do dano (BUCKLEY, 2003). Os fibroblastos são células que produzem os componentes da matriz extracelular, a qual dá suporte aos tecidos (SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011).

Entre as interações celulares no microambiente tumoral, sabe-se que a interação entre células cancerosas e fibroblastos contribui para a iniciação, progressão e metástase do tumor em muitos tipos de tumores. Os fibroblastos associados ao câncer (FACs) são frequentemente abundantes no microambiente tumoral (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

Quando ocorre alguma lesão tecidual, como o tumor, os fibroblastos residentes diferenciam-se em miofibroblastos em resposta a sinais parácrinos. Os miofibroblastos são abundantes em muitos tumores e são também chamados de FACs, sendo frequentemente as células estromais predominantes (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Os FACs, diferentemente de fibroblastos normais proliferam-se rapidamente e produzem altas quantidades de matriz extracelular. Este tipo celular secreta fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento de fibroblastos (FGFs, do inglês *fibroblasts growth factor*) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, do inglês *insulin-like growth factor-1*), que induzem a mitose nas células tumorais. O fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ , do inglês *transforming growth factor- $\beta$* ) induz a transição de células epiteliais em células

malignas e contribui para o microambiente imunossupressor (Figura 4) (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012).

Figura 4 – Ativação dos fibroblastos associados ao câncer



Os fibroblastos quando em contato com a célula tumoral são ativados em miofibroblastos (FACs), secretando altas concentrações de matriz extracelular e substâncias pró-tumorais como o TGF- $\beta$ , que induz a transcrição de células epiteliais em malignas. Legenda: FAC = fibroblasto associado ao câncer; IGF-1 = fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; TGF- $\beta$  = fator de transformação do crescimento beta.

Fonte: elaborado pelo autora.

Os FACs são agentes ativos na progressão tumoral e disseminação metastática, possuindo com as células tumorais uma interação bidirecional. As células tumorais estão envolvidas na ativação dos fibroblastos através da secreção de vários fatores de crescimento. Por sua vez, os FACs ativos têm uma variedade de efeitos tanto sobre as células tumorais como sobre o estroma circundante, incluindo alterações da composição da matriz extracelular (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Assim, fibroblastos produzem matriz extracelular em excesso motivados pelas células tumorais, servindo de barreira contra agentes quimioterápicos (JEONG et al., 2016). Além disso, os FACs podem ativar a polarização M2 dos macrófagos pelo contato físico e também por substâncias como citocinas e fatores de crescimento (COMITO et al., 2013). Por liberarem citocinas, os FACs possuem ação na inflamação e na angiogênese por recrutar macrófagos e estimular a formação de novos vasos (EREZ et al., 2010).

A matriz extracelular produzida principalmente pelos fibroblastos não somente oferece um suporte físico para as células tumorais como também produz fatores angiogênicos e quimiocinas que conferem resistência e elasticidade à massa tumoral. As metaloproteinases (MMPs) produzidas pelas células tumorais, MATs e FACs, auxiliam na degradação da matriz extracelular remodelando o tecido para que as células tumorais possam migrar ou para que as quimiocinas consigam atrair outras células (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012).

## 2.5 CULTURA TRIDIMENSIONAL (3D)

O desenvolvimento de novas terapias que possam driblar as adversidades do microambiente tumoral (como a promoção da progressão e migração celular) é um desafio para as pesquisas (TALUKDAR et al., 2011). O número de candidatos a agentes antitumorais vem crescendo a cada ano, porém a falta de modelos *in vitro* representativos de um microambiente tumoral não acompanha este crescimento, impedindo ou retardando o processo de triagem de testes para novos fármacos (BRESLIN; DRISCOLL, 2013).

Para avaliar se um novo composto tem ou não ação antitumoral, geralmente utiliza-se de métodos convencionais de triagem *in vitro*, como o modelo de monocultura bidimensional (2D). Este modelo é amplamente utilizado e fornece informações básicas necessárias. Porém neste caso, as células tumorais são diretamente expostas a um composto em uma superfície planar, sem que haja interação célula - microambiente tumoral (TALUKDAR et al., 2011).

Um modo de mimetizar *in vitro* o microambiente tumoral é utilizando o modelo de co-cultura. Para isto é necessário no mínimo duas linhagens celulares diferentes para que haja interações célula-célula, sendo uma delas a linhagem tumoral e outra representante do estroma (MIKI et al., 2012).

Neste contexto, algumas variáveis devem ser observadas quando se trata de um modelo de co-cultura: 1) O número de populações: quanto maior o número de populações, mais difícil e complexo torna-se estabelecer a técnica de co-cultura. Para obter-se estabilidade no modelo duas ou no máximo três populações diferentes são requeridas; 2) O grau de contato entre as populações: dependendo do tipo de experimento a ser realizado é preferível o contato direto (contato físico) entre as células ou apenas o contato indireto, este quando se deseja avaliar o efeito de substâncias liberadas por um tipo celular em outra população; 3) O tamanho das populações: é necessário estabelecer a proporção de células

de cada população correlacionando com valores *in vivo*, para que o experimento se torne viável e reprodutível (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014).

Existem dois principais modelos de co-cultura: 2D e 3D. A co-cultura 2D é muito utilizada para avaliar a concentração-resposta de agentes terapêuticos em modelos de células tumorais, entretanto este modelo apresenta limites, pois não mimetiza o microambiente tumoral por tratar-se de uma estrutura planar, o que acarreta um aumento na taxa de proliferação quando comparada aos modelos *in vivo* (JAGANATHAN et al., 2014). Os resultados obtidos em um *screening* de compostos com suposta ação antitumoral realizados em culturas 2D raramente representam a eficiência da terapia *in vivo*. Uma das explicações para isto é a diferença na estrutura de organização celular entre o modelo *in vivo* e o *in vitro*. *In vivo* as células estão estruturadas de maneira 3D, diferentemente das células que aderem e crescem em uma superfície planar como no caso do modelo 2D *in vitro* (LEONARD; COLLNOT; LEHR, 2010). Para melhor simulação do microambiente tumoral, a co-cultura 3D é indicada. Modelos 3D *in vitro* são mais representativos em relação aos mecanismos moleculares e celulares, facilitando o desenvolvimento e a triagem de novas terapias antitumorais, pois recriam a arquitetura do tecido tumoral bem como a heterogeneidade celular (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; ZIETARSKA et al., 2007).

Ao longo dos anos, vários modelos de cultura 3D vêm chamando atenção dos pesquisadores (ABBOTT, 2003; HIRSCHHAEUSER et al., 2010). Alguns trabalhos reconhecem que este modelo simula bem o microambiente tumoral e responde similarmente ao modelo *in vivo* à terapia antitumoral (LEE et al., 2007; NELSON; BISSELL, 2010).

O modelo amplamente utilizado é o modelo tumoral 3D em esferoide. Existem várias metodologias para a formação dos esferoides. Este modelo cria interações célula-célula e célula-matriz semelhantes ao tecido tumoral, as quais são mostradas esquematicamente no Quadro 2 e na Figura 5 (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

Quadro 2 – Metodologias para formação de esferoides

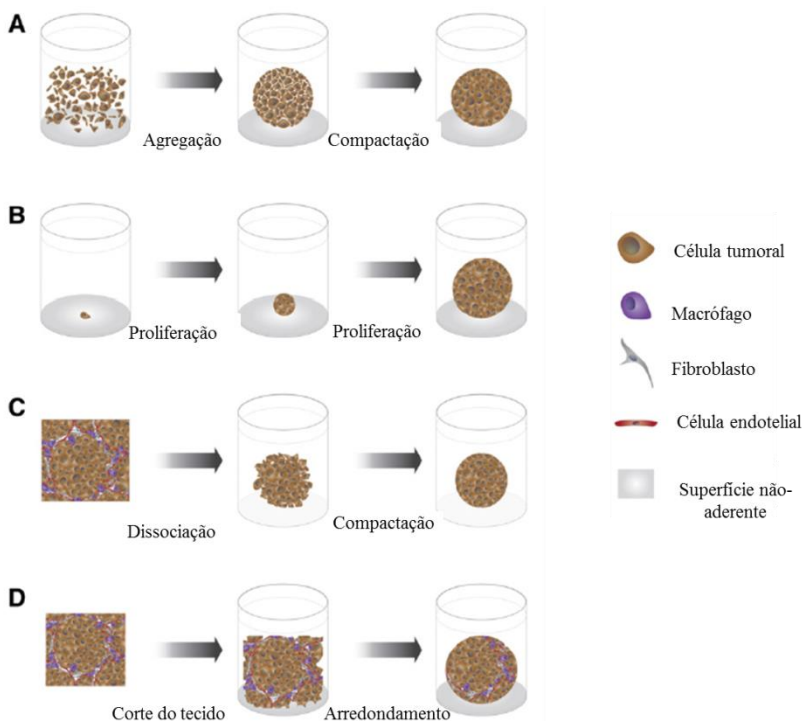
<b>Modelo tumoral em esferoide</b>	<b>Material</b>	<b>Tempo para formação de esfera (dias)</b>
Esferoide tumoral multicelular	Linhagem celular tumoral e outra(s) linhagem(ns) não-tumoral(is)	1 - 7
Tumoresfera	Linhagem celular tumoral única	5 - 7
Esferoide derivado de tumor	Dissociação mecânica ou enzimática do tecido tumoral	1 - 3
Esferoide multicelular derivado do tumor	Pedaço do tecido tumoral	2 - 5

Fonte: adaptado de Weiswald; Bellet; Dangles-Marie (2015).

No modelo esferoide, as células tumorais e o estroma crescem em pequenas esferas que formam uma estrutura 3D contendo células proliferativas, células quiescentes e células necróticas, como no microambiente tumoral (KIM, 2005). Os esferoides geralmente organizam-se de modo a formar zonas de proliferação em uma região periférica e uma zona no interior de células quiescentes pela limitação de nutrientes e oxigênio (MEHTA et al., 2012; ZANONI et al., 2016) (Figura 6), assim como nos tumores sólidos (Figura 2). Este modelo pode ser usado tanto para avaliação de substâncias com ação antitumoral, ou também para a análise da biologia do tumor e comportamento celular neste ambiente, permitindo uma ponte entre a cultura celular 2D *in vitro* e o modelo *in vivo* (YAMADA; CUKIERMAN, 2007).



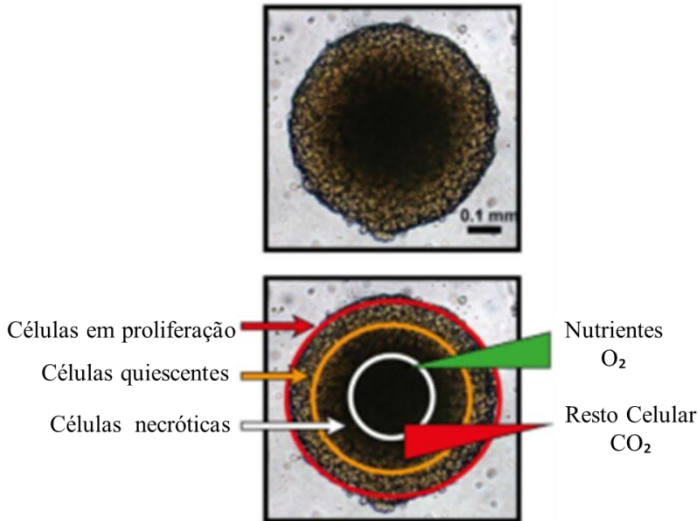
Figura 5 – Metodologias para a formação de esferoides



A) Modelo esferoide tumoral multicelular: utiliza duas ou mais linhagens celulares distintas para a formação do esferoide. B) Modelo de tumoresfera: utiliza apenas a linhagem celular tumoral para a formação do esferoide. C) Modelo de esferoide derivado do tumor: utiliza a célula tumoral de cultura primária para a formação do esferoide. D) Modelo de esferoide multicelular derivado do tumor: utiliza diferentes tipos celulares de cultura primária para a formação do esferoide.

Fonte: adaptado de Weiswald; Bellet; Dangles-Marie (2015).

Figura 6 – Regiões de um esferoide



Divisão do esferoide em regiões. Na região mais externa encontram-se as células em proliferação. Logo em seguida está uma região marcada pelas células quiescentes. Na região interna localizam-se as células necróticas. A concentração de nutrientes e oxigênio (O<sub>2</sub>) é maior na região mais externa. Do contrário, restos celulares e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) são encontrados em maior concentração na região central do esferoide. Ambos formam um gradiente de concentrações.

Fonte: adaptado de Zanoni et al. (2016).

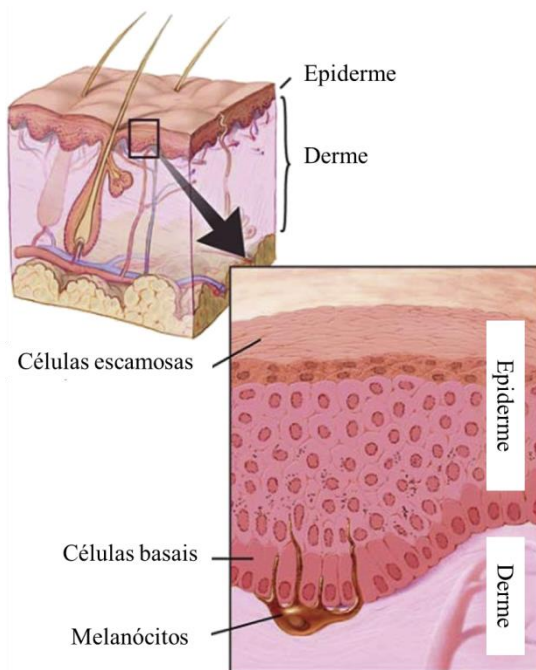
O modelo de co-cultura 3D é muito utilizado na pesquisa de novos fármacos, pois apresenta condições de avaliar efeitos de fármacos em cada tipo celular, além de possibilitar a análise da comunicação entre as distintas populações, as quais podem melhorar, dificultar ou até mesmo bloquear o efeito do fármaco na célula alvo (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014). Neste contexto, torna-se clara a importância da avaliação de potenciais compostos antitumorais em modelos de co-cultura 3D.

## 2.6 MELANOMA

O câncer de pele é classificado de acordo com qual tipo celular deu origem. Existem três principais tipos de câncer de pele: carcinoma

de células basais, carcinoma de células escamosas (ambos nomeados como câncer de pele não melanoma) e o melanoma (que acomete os melanócitos) (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015) (Figura 7). Os melanócitos são células derivadas da crista neural, residem na camada de células basais da epiderme (HUSSEIN, 2006), e são produtores de melanina, a qual é responsável pela cor da pele, olhos, pelos e cabelos (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Figura 7 – Principais células envolvidas no câncer de pele



Epiderme: Células escamosas, basais e melanócitos, que encontram-se adjacentes a camada de células basais.

Fonte: adaptado de: *National Cancer Institute* (2017).

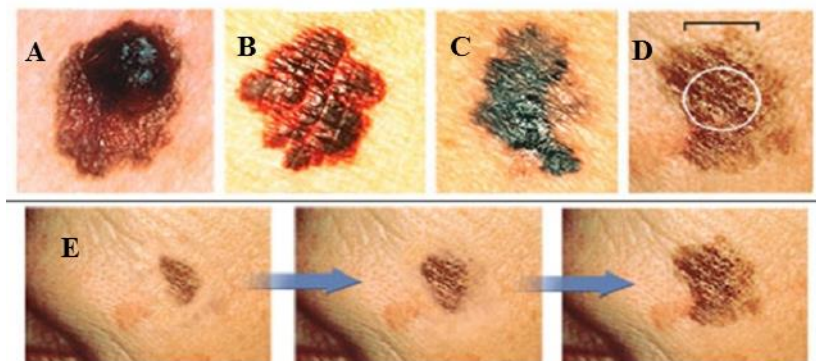
A incidência do câncer de pele vem aumentando a cada ano, estima-se um valor total (melanoma e não melanoma) de 3 milhões de novos casos por ano mundialmente (WHO, 2017). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2017b), no Brasil o câncer de pele não melanoma é o mais frequente, tendo como incidência anual um

valor de 175 mil casos e 1.769 casos de mortes. Já o melanoma é bem menos frequente com uma incidência de 5 mil casos, porém apresenta um número de mortes elevado de 1.547 anuais (INCA, 2017c).

O melanoma, também chamado de melanoma maligno ou metastático, por ser agressivo e pela capacidade de metastatizar, é uma das formas mais mortais de câncer. Embora o melanoma em estágio inicial seja em grande parte curável, através de intervenção cirúrgica, as taxas de sobrevivência são de 5 % a 19 % para a doença avançada, o que reflete na ausência de tratamentos eficazes para o melanoma metastático (SANDRU et al., 2014). O melanoma tem potencial metastático agressivo, particularmente para os gânglios linfáticos, pulmão e cérebro (RIGEL; CARUCCI, 2000). Outros fatores que têm sido associados com baixa sobrevida incluem a idade mais avançada, gênero masculino, maior número de sítios metastáticos, hipoalbuminemia, neutrofilia e leucocitose (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009)

A maioria dos melanomas malignos surgem na superfície da pele, sendo detectáveis por exame visual. As características clínicas do melanoma maligno variam muito. A regra ABCDE descreve a apresentação clínica e sinais de alerta para a maioria dos melanomas: A, representa assimetria; B, irregularidades da borda; C cor, pois a pigmentação não é uniforme; D, diâmetro superior a 6 mm; E, representa evolução, elevação e/ou aumento de lesão, como visto na Figura 8 (GORDON, 2013).

Figura 8 - Características visuais do melanoma maligno (ABCDE dos sinais)



Legenda: A) assimetria; B) bordas irregulares; C) cor não uniforme; D) diâmetro superior a 6 mm; E) evolução.

Fonte: adaptado de *Skin Cancer Foundation* (2016).

A pele humana compreende uma camada epidérmica contendo principalmente queratinócitos em associação aos melanócitos, e uma camada dérmica contendo vários tipos de células, incluindo fibroblastos que sintetizam componentes de matriz extracelular (SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011). Os queratinócitos formam uma camada basal proliferativa e diferenciam-se à medida que se movem em direção à superfície da pele, enquanto os melanócitos, as células precursoras do melanoma, proliferam menos frequentemente e permanecem na junção epidérmico-dérmica, onde interagem com queratinócitos da camada basal para regular a pigmentação da pele em resposta à radiação UV (BANDARCHI et al., 2013). Uma membrana basal, composta de moléculas da matriz extracelular, incluindo laminina e colágenos tipo IV, VII e XVII, separa os melanócitos dos fibroblastos da epiderme (FLEISCHMAJER et al., 1998). No entanto, quando os melanócitos transformam-se em células de melanoma hiperproliferativas e migratórias invadem a derme pela membrana basal (BOYCE, 2001). As células de melanoma estão em estreita proximidade ou em contato direto com fibroblastos durante os estágios iniciais da progressão tumoral, os quais podem auxiliar ou impedir a progressão tumoral. Ainda, foi demonstrado que o crescimento de células de melanoma isoladas de lesões precoces é reprimido por fibroblastos dérmicos, enquanto que as células de melanoma metastático tem crescimento estimulado na

presença destes fibroblastos, outro aspecto que evidencia a importância do estroma para o desenvolvimento tumoral (CORNIL et al., 1991).

O mecanismo subjacente à agressividade do melanoma é incompletamente compreendido. As evidências sugerem que o crescimento do melanoma é influenciado tanto pela resposta imune do hospedeiro quanto pelo estroma, principalmente pelas células inflamatórias, dentro do microambiente tumoral. Entre as células inflamatórias, acredita-se que os macrófagos desempenhem o papel mais importante nesta malignidade. Macrófagos associados ao tumor (MATs) desempenham um papel crítico na regulação da angiogênese e no crescimento do melanoma, evidenciando uma correlação entre a densidade de MATs e o prognóstico do melanoma (MAKITIE et al., 2001).

Desde 1975, após aprovação inicial pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, a dacarbazina continua a ser o tratamento padrão para a maioria dos pacientes com melanoma. A dacarbazina é tipicamente administrada por via intravenosa com doses repetidas a cada três a quatro semanas. A toxicidade comum inclui náuseas e vômitos leves, mielossupressão e fadiga, e a maioria dos pacientes é capaz de manter a qualidade de vida inicial. Apesar da baixa eficácia, a dacarbazina continua a ser o "tratamento padrão" de melanoma metastático, pois não foi ainda demonstrado que outra terapia tenha um benefício de sobrevivência significativo em relação a este fármaco. (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009).

As terapias sistêmicas incluem quimioterapia citotóxica, imunoterapia ou terapias combinadas. Além disso, muitas novas terapias estão atualmente sob investigação, pois ainda nenhum agente quimioterápico oferece uma taxa de resposta superior a 25 % (RIGEL; CARUCCI, 2000). O melanoma é considerado um tumor relativamente resistente à radioterapia, mas os pacientes podem obter algum benefício clínico da radiação de metástases sintomáticas. A radioterapia é utilizada em combinação à terapia sistêmica (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009). Por apresentar uma complexa interação com o sistema imunológico, a imunoterapia é uma das classes de tratamento do melanoma que vem crescendo em importância. O uso dos anticorpos monoclonais que visam pontos críticos de controle imunológico, conduzindo assim à ativação de linfócitos T, é um exemplo. Outro alvo muito importante para o tratamento de melanoma é a via das proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*), as quais são frequentemente superexpressas no melanoma, sendo ativadas por alterações genéticas. Esta via tem como

objetivo regular a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. A mais comum das alterações genéticas desta via é a mutação do gene B-RAF presente em 40 % a 50 % dos melanomas. Mutações em N-RAS são encontradas em outros 15 % a 25 % dos casos (SULLIVAN; LORUSSO; FLAHERTY, 2013).

## 2.7 SAIS DE ISOTIOURÔNIO

Em estudo anterior do nosso grupo, alguns sais de isotiourônio apresentaram potencial atividade antitumoral. Foi demonstrado que os sais apresentaram resultados promissores em linhagens de leucemia, indicando concentração citotóxica para 50 % das células ( $CC_{50}$ ) entre 3-12  $\mu$ M. Os sais causaram a morte celular por apoptose, aparentemente pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e pela indução da perda do potencial de membrana mitocondrial (ASSUNÇÃO, 2013).

Sais de isotiourônio constituem uma classe de compostos biologicamente importante, com atividades biológicas já descritas como, anestésica (REGAN, GALYSH, MORRIS, 1967), anti-inflamatória (TRANI et al., 1989) e antitumoral (CISILOTTO et al., 2015; VÉRTESI, MOLNAR, GUCZOGHY, 1985). Estes sais têm sido estudados como inibidores da proteína cinase-C (HENDRICKS et al., 1995) e agonistas dos receptores de GABA (ALLAN, et al., 1997) e de histamina-H3 (GANELLIN, et al., 1992).

Adicionalmente, outro estudo, também de nosso grupo, mostrou que os sais de isotiurônio denominados MF01, MF02 e MF03 foram os mais citotóxicos para linhagens celulares de melanoma. Entre uma série de compostos testados, estes provocaram alterações morfológicas nas células, diminuição da proliferação celular e interferência na migração e invasão celular, bem como a diminuição da expressão do oncogene N-RAS, gene relacionado com a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (CISILOTTO et al., 2015).

Por estes sais mostrarem resultados satisfatórios utilizando linhagens de melanoma no estudo de Cisilotto et al (2015) e por não haver na literatura relatos do uso destes sais na cultura tridimensional (3D) tumoral, decidiu-se no presente estudo, utilizar um sal de isotiourônio na cultura 3D de melanoma associado à macrófagos e fibroblastos.





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi implantar um modelo *in vitro* de cultura celular murina tridimensional (3D) mimetizando as células em um microambiente tumoral visando o enriquecimento da avaliação da atividade de novos agentes antitumorais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir os constituintes celulares e as condições apropriadas para o modelo de cultura celular 3D;
- Caracterizar o modelo 3D em relação ao tamanho e a quantificação celular
  - Analisar a viabilidade celular no modelo 3D;
  - Observar o padrão de organização celular no modelo 3D
  - Avaliar o perfil inflamatório dos macrófagos após polarização no modelo 3D;
  - Comparar o efeito citotóxico do sal de isotiourônio MF03 e da dacarbazina nos modelos 3D e 2D

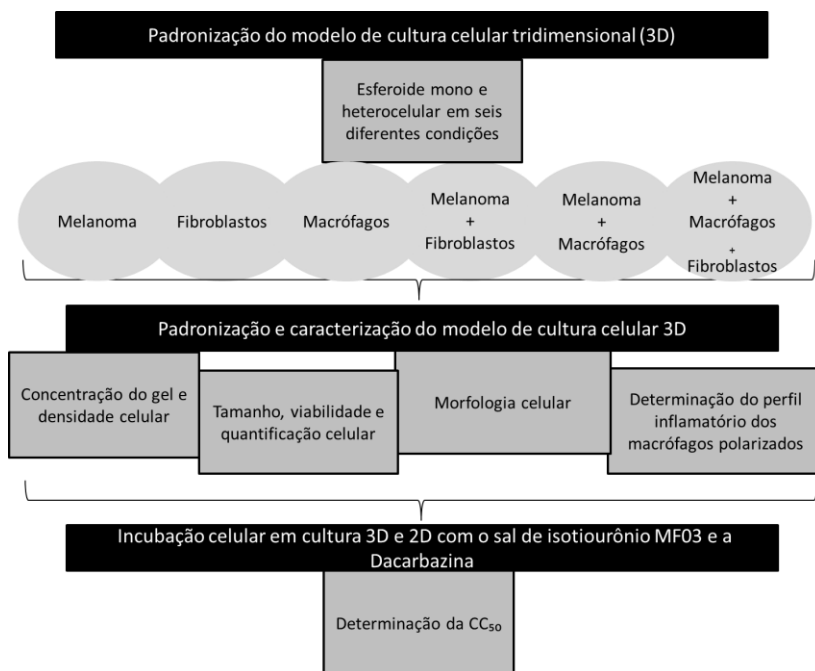


## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Abaixo apresenta-se um esquema do desenho experimental deste trabalho, no intuito de esclarecer o leitor e facilitar a compreensão das análises realizadas (Figura 9).

Figura 9 - Esquema do desenho experimental



Legenda:  $CC_{50}$  = Concentração citotóxica para 50 % das células.

### 4.2 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados no estudo estão listados no Quadro 3.

Quadro 3 – Lista de reagentes

Reagente	Sigla
4'-6-diamino-2-fenilindol <sup>1</sup>	DAPI
Agarose <sup>2</sup>	-
Azul de tripano <sup>1</sup>	-
Bálsamo do Canadá <sup>3</sup>	-
Dacarbazina <sup>1</sup>	-
Dexametasona <sup>1</sup>	DEX
Digitonina <sup>1</sup>	-
Dimetilsulfóxido <sup>1</sup>	DMSO
<i>Dulbecco Modified</i>	DMEM
<i>Eagles's Medium</i> <sup>4</sup>	
Eosina amarela <sup>5</sup>	-
Estreptomicina <sup>4</sup>	-
<i>Fuse-it-color</i> <sup>6</sup>	-
Hematoxilina de Harris <sup>7</sup>	-
Hexametildisilazano <sup>8</sup>	HMDS
Iodeto de propídeo <sup>1</sup>	IP
Lipopolissacarídeo <sup>1</sup>	LPS
p-nitrofenol fosfato <sup>1</sup>	-
Penicilina <sup>4</sup>	-
Soro bovino fetal <sup>4</sup>	SBF
Tampão de ácido N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] <sup>4</sup>	HEPES
Tetróxido de ósmio <sup>1</sup>	-
<i>Tissue-tek</i> <sup>9</sup>	-
Tripsina <sup>4</sup>	-

<sup>1</sup> Sigma® - EUA; <sup>2</sup> Ludwig Biotec Ltda – BR; <sup>3</sup> Soldan Ltda – BR; <sup>4</sup> Gibco® - EUA; <sup>5</sup> Dinâmica Ltda – BR; <sup>6</sup> Ibidi® - EUA; <sup>7</sup> NewProv – BR; <sup>8</sup> SPI-chem® - EUA; <sup>9</sup> Sakura Finetek® - EUA.

#### 4.3 CULTURA CELULAR

Foram selecionadas três linhagens para execução do modelo 3D de cultura celular: macrofágica (J774, *Mus musculus*), tumoral de melanoma (B16F10, *Mus musculus*) e fibroblástica (NIH/3T3, *Mus musculus*) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> em atmosfera de 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 37 °C em meio *Dulbecco Modified Eagles's Medium* (DMEM), pH 7,4 suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF),

estreptomicina, penicilina e tampão de ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES). O meio foi trocado a cada 24 ou 48 horas e todos os experimentos foram realizados entre as passagens dois e dez. As células foram sub-cultivadas quando atingiram aproximadamente 80 % de confluência, utilizando solução tampão fosfato-salino (PBS – 1×) para lavagem e, após, tripsina para dissociação celular enzimática por 2 minutos a 37 °C. A ação da tripsina foi inibida com meio DMEM + 10 % SBF. Exclusivamente a linhagem de macrófagos J774, que apresenta um mecanismo de adesão diferente, foi sub-cultivada utilizando o *cell scraper* (rodo para células em cultura). Para cada experimento, as células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio do azul de Tripano. Este corante é internalizado por células com membrana rompida (não viáveis), corando-as de azul. O número de células plaqueadas e o tempo de incubação foram adequados para cada experimento. Os estoques celulares foram mantidos em DMEM contendo 10 % de SBF e 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) a aproximadamente -180 °C, em reservatório de nitrogênio líquido.

#### 4.4 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D)

##### 4.4.1 Cultura 3D

O modelo esferoide tumoral multicelular 3D foi executado conforme descrito por Friedrich et al., (2009) com modificações. Neste modelo, é necessário que as linhagens celulares (todas com propriedades aderentes) não adiram às placas, mas tão somente entre elas, permitindo assim a formação de uma estrutura esferoide. Para isto, optou-se por adicionar ao fundo de cada poço da placa uma camada de gel de agarose.

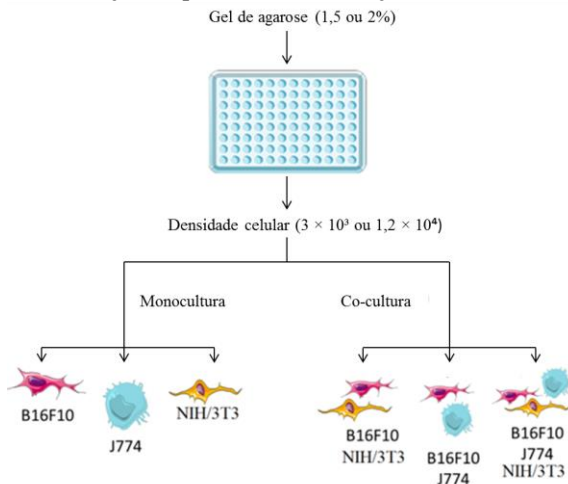
Inicialmente, foi realizada a padronização da concentração do gel de agarose, a fim de obter a melhor condição de cultura 3D, ou seja, aquela na qual as células sejam capazes de formar um único esferoide/poço. Para este fim, o pó de agarose foi dissolvido em água destilada em duas concentrações (1,5 ou 2 %) e solubilizado em banho-maria à temperatura de 60 °C. Ainda no estado líquido, o gel foi manipulado em cabine de segurança biológica e transferido para placas de 96 poços, no volume de 50 µL/poço. Posteriormente, as placas contendo o gel de agarose foram esterilizadas por radiação UV durante

30 minutos. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora a 37 °C durante 30 minutos para completa gelificação.

Posteriormente, foi realizada a padronização da densidade celular para o cultivo 3D. As três linhagens celulares foram cultivadas (volume total por poço de 200 µL) isoladamente (monoesferoides) ou no modelo de co-cultura (heteroesferoides) em duas densidades totais:  $3 \times 10^3$  ou  $1,2 \times 10^4$  células/poço. No modelo de co-cultura, as células foram cultivadas nas seguintes proporções: 1:1 (B16F10:J774), 1:1 (B16F10:NIH/3T3) e 1:1:1 (B16F10:J774:NIH/3T3), totalizando seis diferentes condições como ilustrado na Figura 10.

Em todas as condições as células foram cultivadas por quatro dias em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, sendo este tempo necessário para formação do esferoide. Após esse período, os esferoides foram fotografados no microscópio Nikon Eclipse TS100 nos aumentos de 40 e 100×. Metade do volume de meio celular foi retirado e substituído pelo mesmo volume de meio celular fresco. Após mais três dias (totalizando sete dias) os esferoides foram novamente fotografados, fixados e armazenados a 4 °C e o sobrenadante celular foi armazenado em freezer -80 °C até a realização das análises.

Figura 10 – Padronização do protocolo de formação dos esferoides



Esquematisação das duas tentativas de concentrações de gel de agarose e da densidade celular total utilizada para a formação dos esferoides em todas as condições de cultura 3D realizadas. Legenda: B16F10 (melanoma); J774 (macrófago); NIH/3T3 (fibroblasto).

Fonte: elaborado pela autora.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D

Após o estabelecimento das condições experimentais adequadas quanto a concentração do gel de agarose e a densidade celular para formação dos esferoides, foram analisadas as demais condições incluindo: quantificação celular, viabilidade celular, dimensões, morfologia e perfil inflamatório dos esferoides.

### 4.5.1 Tamanho dos esferoides

Para avaliar o crescimento dos esferoides, foram capturadas imagens com o intuito de analisar a área e o diâmetro das estruturas. No quarto e sétimo dias de cultivo 3D, cada poço, contendo um único esferoide, foi fotografado em microscópio de luz nos aumentos de 40 e 100×. As imagens foram obtidas pelo *software ScopePhoto 3.0*.

Para o cálculo da área, a imagem dos esferoides foi contornada e determinada em valores de *pixels* pelo *software ImageJ*. Admitiu-se que a área delimitada e determinada no quarto dia em *pixels*, correspondeu a um valor de 100 %. Este resultado foi comparado ao valor da área em *pixels* do sétimo dia, que, se maior em relação ao quarto dia, torna-se sugestivo de crescimento do esferoide. Para isso foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\% \text{ crescimento do esferoide} = \frac{(\text{pixels } 7^{\text{º}} \text{ dia} - \text{pixels } 4^{\text{º}} \text{ dia})}{\text{pixels } 4^{\text{º}} \text{ dia}} \times 100$$

O diâmetro dos esferoides também foi calculado pelo *software ImageJ* em que considerou-se apenas o valor do diâmetro horizontal.

### 4.5.2 Quantificação celular

A contagem de células para a cultura 3D foi realizada após sete dias de cultivo. Para isso, oito esferoides de cada condição foram transferidos para microtubos, lavados duas vezes com solução tampão PBS 1× e dissociados por ação enzimática da tripsina. A ação da tripsina foi interrompida por adição de meio de cultura celular DMEM acrescido de 10 % SBF. As células já dissociadas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução tampão PBS 1× e coradas com Azul de Tripiano (1:1 v/v) para contagem em câmara de Neubauer. Células viáveis e não viáveis foram contabilizadas separadamente.

### 4.5.3 Viabilidade celular

Para verificar a viabilidade das células em cultura 3D, foi utilizado o método que proporciona a análise da integridade da membrana celular por citometria de fluxo descrito por Ross et al. (1989) com modificações. Este método baseia-se na adição do iodeto de propídeo (IP), um marcador nuclear fluorescente, o qual penetra somente em células com a membrana não-integra, emitindo fluorescência com alta intensidade.

Após sete dias de cultivo os esferoides foram transferidos para microtubos (oito esferoides por condição), lavados duas vezes com solução tampão PBS 1× e dissociados por ação enzimática da tripsina. A ação da tripsina foi interrompida por adição de meio de cultura celular DMEM acrescido de 10 % SBF. As células já dissociadas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução tampão PBS 1× e marcadas com IP (2 µg/mL). Para o controle positivo, foi adicionado aos esferoides a digitonina (30 µg/mL), uma saponina conhecida por romper membranas (HSUCHEN; FEINGOLD, 1973; WENG et al., 2012). Para o controle negativo foram utilizadas as células referentes a cada condição sem adição de digitonina, e para o branco, foram utilizados os esferoides sem a marcação de IP. A análise foi realizada e quantificada pelo citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). As populações de células foram determinadas por meio de *dot plots* e histogramas utilizando o programa Flowing 2.5 e consideradas conforme a seguir:

- i) Células íntegras (viáveis): IP negativo.
- ii) Células não-íntegras (não viáveis): IP positivo.

### 4.5.4 Morfologia celular

#### 4.5.4.1 Morfologia celular externa dos esferoides

A análise da morfologia celular externa do esferoide foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência. Para a varredura, as estruturas foram transferidas para microtubos, lavadas duas vezes com solução tampão PBS 1× e fixadas com solução de glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído 4 % por 30 minutos. Em seguida, os esferoides foram recobertos com tetróxido de ósmio por 1 hora, lavados duas vezes com água destilada. Posteriormente, os esferoides foram desidratados através de quatro banhos consecutivos de



álcool etílico absoluto diluído com água destilada em quatro diferentes concentrações (80, 90, 96 e 100 %), permanecendo 10 minutos em cada concentração. Os esferoides desidratados foram incubados com hexametildisilazano (HMDS) em uma primeira vez diluído em álcool absoluto (1:1) por 15 minutos. Na segunda vez, os esferoides foram incubados em HMDS puro por duas vezes de 15 minutos cada. Por fim, os esferoides foram recobertos por HMDS puro *overnight*, até completa evaporação, e então transferidos para uma membrana de carbono adesivo recobertos com ouro para análise no microscópio de varredura JEOL JSM-6390LV *Scanning Electron Microscope* no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). As etapas de preparação da amostra foram realizadas segundo as normas do LCME.

Para a microscopia de fluorescência, oito esferoides de cada condição foram transferidos para microtubos, lavados duas vezes com solução tampão PBS 1×, fixados com paraformaldeído 4 % durante 30 minutos e lavados novamente duas vezes com solução tampão PBS 1×. Em seguida, os esferoides foram incubados por 5 minutos com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para marcação do núcleo lavados 2 vezes com solução tampão de PBS e analisados em microscópio de fluorescência.

#### 4.5.4.2 Morfologia celular interna dos esferoides

A análise da morfologia celular interna dos esferoides foi realizada em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE). Primeiramente, oito estruturas de cada condição foram transferidas para microtubos, lavadas duas vezes com solução tampão PBS 1×, fixadas com paraformaldeído 4 % durante 30 minutos e lavadas novamente duas vezes com solução tampão PBS 1×. Em seguida, os esferoides foram incubados com uma solução crioprotetora de sacarose 30 % por 24 horas e por fim incorporados no Tissue-Tek e então armazenados em freezer -80 °C por no mínimo 24 horas. Após, foi realizada a criosecção dos esferoides em criostato a -20 °C, os cortes foram imediatamente alocados em lâminas silanizadas.

Para a realização da análise histológica dos cortes pela coloração com HE, as amostras foram inicialmente lavadas em água destilada. Logo após, coradas com hematoxilina de Harris durante 5 minutos, lavadas com água destilada e coradas com eosina amarela 5 % durante 8 minutos. As amostras foram então lavadas e desidratadas em séries crescente de álcool (70 e 100 %), diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá. As lâminas histológicas foram visualizadas no

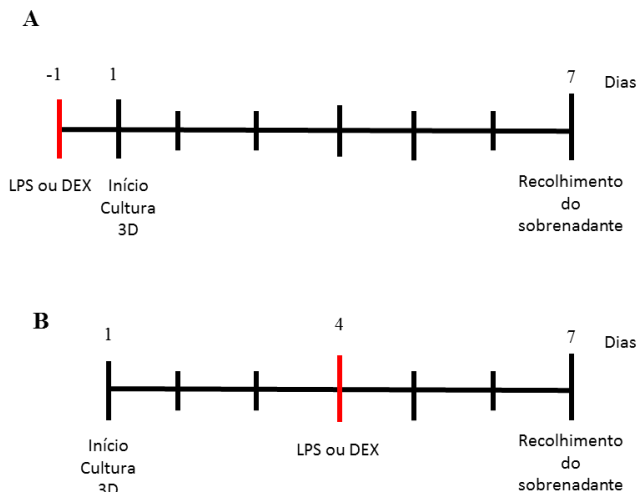
microscópio Olympus BX41 com câmera Olympus SC30 no aumento de 200× utilizando o *software AnalySIS* para captura das imagens.

#### 4.5.5 Perfil inflamatório

Para obter macrófagos polarizados em M1 (pró-inflamatório/antitumoral) e M2 (anti-inflamatório/pró-tumoral) o período de ativação foi primeiramente padronizado. As substâncias selecionadas para a polarização dos macrófagos (linhagem celular J774) foram: lipopolissacarídeo (LPS 1000 ng/mL) para polarização M1 – pró-inflamatório/antitumoral (MOSSER; ZHANG, 2008) e dexametasona (DEX 10 mM) para polarização M2 – anti-inflamatório/pró-tumoral (VOGEL et al., 2014). O tempo de ativação dos macrófagos (linhagem J774) ocorreu em dois períodos e em duas culturas 3D distintas: 1) antes da utilização das células para a cultura 3D (ainda em garrafa, onde o meio de cultura celular DMEM da linhagem J774 em duas garrafas foi substituído por um volume de 15 mL de meio contendo cada garrafa uma das substâncias polarizadoras em suas devidas concentrações), ficando as substâncias por 24 horas em contato com as células (Figura 11A). Após, o meio foi retirado, as células foram lavadas com solução tampão PBS 1× e dissociadas para seguir com a realização da cultura 3D. 2) no dia 4 após formação dos esferoides (já em placa nas quais o meio de cultura celular DMEM de todas as condições 3D foi substituído por um volume de 100 µL/poço de meio contendo as substâncias ativadoras em suas devidas concentrações), ficando as substâncias por três dias em contato com os esferoides (Figura 11B). No sétimo dia de cultivo, o sobrenadante de oito esferoides de cada condição foi recolhido em microtubos, centrifugado e armazenado em freezer -80 °C para análise.

Nota: Para polarização M2, primeiramente adicionou-se DEX por 4 horas, após o meio foi substituído com meio novo contendo LPS *overnight*.

Figura 11 – Tentativas de polarização dos macrófagos



Linha do tempo ilustrando o momento de polarização dos macrófagos. A) a polarização dos macrófagos com LPS (lipopolissacarídeo) e DEX (dexametasona) ocorreu no dia -1, ou seja, 24 horas antes do início da cultura 3D. B) a polarização dos macrófagos ocorreu no dia 4 de cultivo 3D. O sobrenadante foi recolhido no dia 7 (último dia de cultura 3D).

Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.5.5.1 Perfil de liberação de óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ )

A determinação de  $\cdot\text{NO}$  foi realizada nos sobrenadantes celulares coletados no sétimo dia da cultura 3D (pós-ativação dos macrófagos). A análise foi realizada determinando a concentração de  $\cdot\text{NO}$  (nitrito/nitrato), que é proporcional ao óxido nítrico presente no sobrenadante celular, pelo método colorimétrico de Griess (1879). Neste método nitrito e nitrato presentes no sobrenadante celular reagem com a sulfanilamida 1 % (solução A) em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED – solução B) 0,1 %, gerando um composto de coloração rósea. A reação é controlada pelo tempo, e o produto é determinado entre 10 minutos e 2 horas após a mistura dos reagentes. A leitura foi realizada espectrofotometricamente (540 nm), utilizando um leitor de microplacas e uma curva analítica, através da diluição de uma solução estoque de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio DMEM. Em todos os poços (branco – apenas o meio DMEM, padrões – curva analítica de concentrações

crescente de  $\text{NaNO}_2$  e sobrenadante celular) foi adicionado o reagente de Griess (solução A + solução B). Foram utilizadas alíquotas de sobrenadante celular de um *pool* de oito esferoides de cada condição para esta análise.

#### 4.5.5.2 Perfil de liberação de citocina Interleucina-6 (IL-6)

Para identificar o perfil de IL-6 liberada pelos macrófagos no sobrenadante celular da cultura 3D foi realizado o ensaio imunoenzimático de captura murino (do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ELISA), o qual gera um sinal proporcional à quantidade de citocina no sobrenadante celular que pode ser determinada em espectrofotômetro (405 nm).

Para este ensaio, foram utilizadas placas de poliestireno, as quais foram montadas e padronizadas conforme orientações do fabricante (*Kits Cytokine ELISA BD Biosciences®* - USA). A concentração de citocina foi avaliada por uma curva analítica específica do *kit* ELISA, nas devidas diluições quando necessário. O limite de detecção é de 1 pg/mL. Foram utilizadas alíquotas do sobrenadante celular de um *pool* de oito esferoides de cada condição para esta análise.

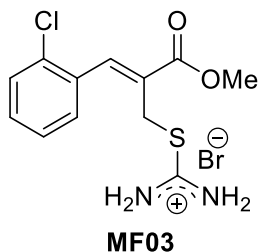
### 4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CULTURA 3D COM O SAL DE ISOTIOURÔNIO MF03

Após todas as etapas de caracterização e validação do modelo 3D escolhido, atinge-se a etapa de analisar a possível atividade antitumoral do sal de isotiourônio neste modelo.

#### 4.6.1 Síntese do composto orgânico

O sal de isotiourônio nomeado MF03 (solúvel em dimetilsulfóxido – DMSO) foi sintetizado conforme descrito por Ferreira; Sá (2015), e fornecido pelo Prof.º Dr. Marcus Mandolesi Sá, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (Figura 12).

Figura 12 – Estrutura do sal de isotiourônio MF03



PM - 365.67 g/mol

Fórmula -  $C_{12}H_{14}BrClN_2O_2S$

Fonte: adaptado de Ferreira; Sá (2015).

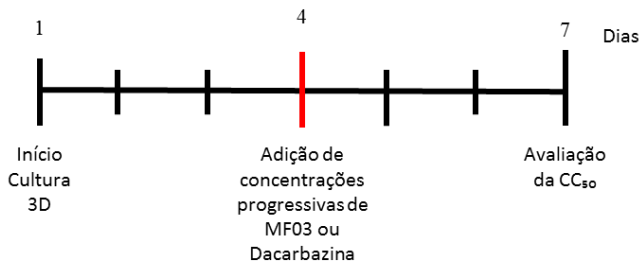
#### 4.6.2 Determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>)

Para determinar a CC<sub>50</sub> do sal de isotiurônio no modelo 3D, foi utilizado o ensaio da fosfatase ácida conforme descrito por Yang; Sinai; Kain (1996) com modificações. Este método baseia-se na atividade da enzima fosfatase ácida citosólica, a qual hidroliza o p-nitrofenol fosfato em p-nitrofenol. A absorção em 405 nm é diretamente proporcional ao número de células. Após quatro dias de formação dos esferoides, metade do volume de meio celular DMEM foi substituído por meio novo contendo concentrações crescentes do sal MF03 (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500  $\mu$ M) (Figura 13). A dacarbazina foi utilizada como padrão nas mesmas concentrações e além disso, foram utilizados controles de células incubadas com e sem DMSO, diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver o composto. Após 72 horas de incubação (sete dias de cultura 3D), oito esferoides de cada condição foram transferidos para placas de 96 poços sem gel de agarose, centrifugados a 800 $\times$  g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com solução tampão PBS 1 $\times$  repetindo-se a etapa de centrifugação. Uma solução tampão contendo 0,1 M de acetato de sódio; 0,1 % de triton-X-100 e 5 mM de p-nitrofenol fosfato em pH 4,8 foi preparada e adicionada em cada poço. A solução foi incubada por 90 minutos a 37 °C e ao fim da

incubação adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) 1N, q.s.p. 0,1 N final em cada poço para leitura em comprimento de onda de 405 nm.

A densidade óptica do grupo-controle foi considerada como equivalente a 100 % de células viáveis. A  $CC_{50}$  do composto foi calculada com auxílio do programa *GraphPad Prism 5*, por meio de regressão não linear, com interpolação (50 % de viabilidade) da curva (log da concentração *versus* resposta).

Figura 13 – Incubação dos esferoides com o sal de isotiourônio MF03 e dacarbazina



Os esferoides foram incubados com concentrações progressivas do sal de isotiourônio MF03 ou dacarbazina no quarto dia de cultura 3D.  $CC_{50}$  = Concentração citotóxica para 50 % das células.

Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata em dias alternados,  $n=3$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e analisados estatisticamente, por meio do programa *GraphPad Prism 5*, utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste Bonferroni ou teste t-Student pareado ou não pareado. Um valor de probabilidade menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado estatisticamente significativo.

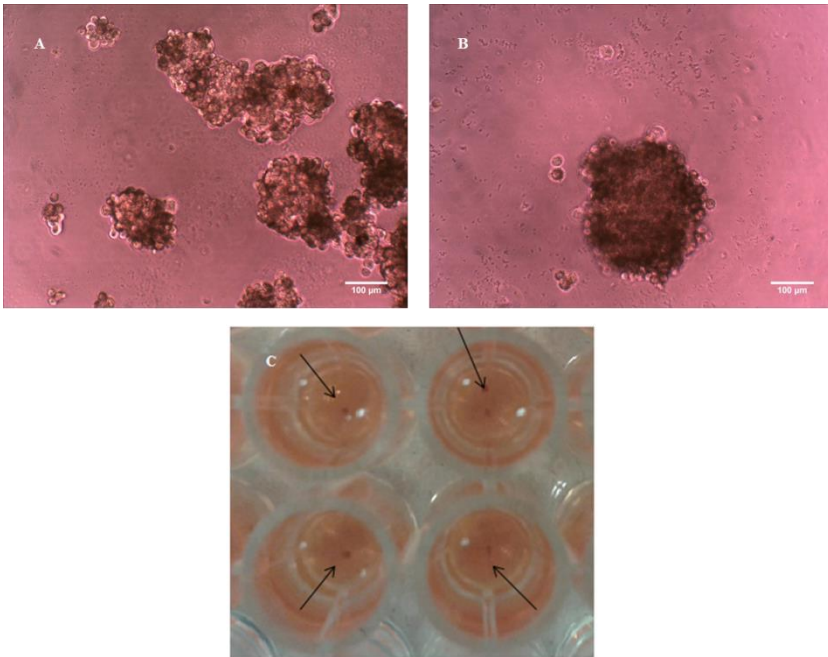
## 5 RESULTADOS

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D)

O modelo escolhido para a execução desse trabalho foi o esferoide tumoral mono e multicelular. Neste modelo, as células devem agregar-se umas as outras e compactar-se formando uma estrutura 3D única com forma esferoidal. Neste caso, é necessário impedir que haja aderência das células à placa, para isso, uma camada de gel de agarose pode ser utilizada (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

A fim de avaliar a concentração de agarose mais adequada para o cultivo 3D, foram selecionadas as concentrações de 1,5 % e 2 % para a preparação do gel. Inicialmente, foi utilizado o gel de agarose na concentração 1,5 %, nesta condição o modelo não foi eficiente, pois resultou em esferoides múltiplos por poço após sete dias de cultivo em todas as condições (Figura 14A). Baseado neste resultado, optou-se por aumentar a concentração de agarose e desta forma diminuir a interação das células com o hidrogel na tentativa de induzir a formação de esferoide único por poço. Com a concentração de agarose a 2 %, foram obtidos esferoides únicos em todos os poços (Figura 14B) após sete dias de cultivo. Os esferoides obtidos apresentaram um tamanho aproximado de 200-400  $\mu\text{m}$  dependendo da condição, podendo ser visualizados macroscopicamente (Figura 14C).

Figura 14 – Tentativa de formação de esferoide em diferentes concentrações de agarose

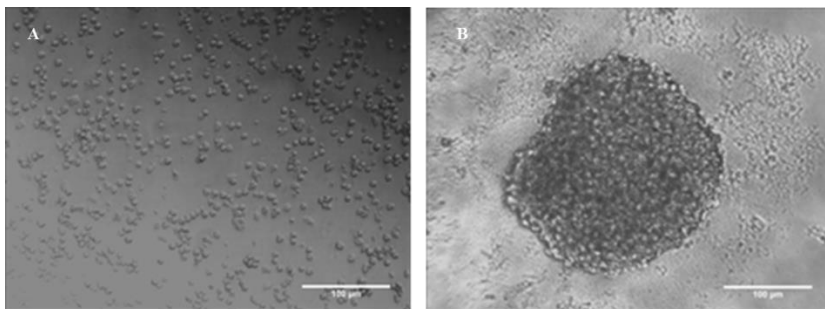


A) Heteroesferoides 3D (B16F10:J774:NIH/3T3) em gel de agarose 1,5 %. Presença de vários esferoides com tamanhos e formatos irregulares. Barra de escala: 100 µm. B) Heteroesferoide 3D (B16F10:J774:NIH/3T3) em gel de agarose 2 %. Presença de esferoide único. Barra de escala: 100 µm. C) Monoesferoide 3D (linhagem B16F10). As setas pretas indicam os esferoides. As figuras estão exemplificadas em algumas condições, porém em todas as condições foram observadas as mesmas características.

Em seguida, foi padronizada a densidade celular da cultura 3D utilizando o gel de agarose 2 %. Inicialmente, foi realizada a cultura com  $3 \times 10^3$  células/poço, neste modelo após sete dias de cultivo não houve a formação de esferoides e as células ficaram apenas em suspensão espalhadas pelo poço (Figura 15A). Na segunda tentativa de densidade avaliada ( $1,2 \times 10^4$  células/poço), após o cultivo de quatro dias as células formaram esferoides e permaneceram assim até o último dia de cultivo (Figura 15B).



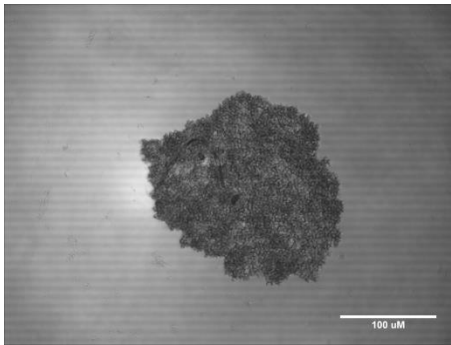
Figura 15 – Tentativas de formação de esferoides em diferentes densidades celulares



A) Não formação de esferoides em densidade de  $3 \times 10^3$  células/poço (B16F10:J774. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . B) Esferoide único formado (B16F10:J774) com a densidade de  $1,2 \times 10^4$  células/poço. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . As figuras estão exemplificadas em algumas condições, porém em todas as condições foram observadas as mesmas características.

Todas as condições (mono e heteroesferoides 3D) foram avaliadas e apresentaram resultados similares na padronização da concentração do gel e densidade celular (dados não apresentados), exceto a condição 3D utilizando apenas a linhagem macrófágica (J774), a qual não foi capaz de formar esferoide. Neste caso, as células apenas se agruparam ao centro do poço com ausência de compactação, não formando uma estrutura 3D (Figura 16). A condição utilizando apenas a linhagem macrófágica foi então descartada dos experimentos posteriores.

Figura 16 – Monocultura de macrófagos (J774)



Aglomerado celular em monocultura de macrófagos: não formação de estrutura 3D. Barra de escala: 100 µm.

Em função dos resultados satisfatórios obtidos na formação de esferoides em cinco das seis condições utilizadas (B16F10; NIH/3T3; B16F10:NIH/3T3; B16F10:J774; B16F10:J774:NIH/3T3) em gel de agarose 2 % e na densidade celular a  $1,2 \times 10^4$  células/poço, foram selecionadas estas condições para os próximos experimentos.

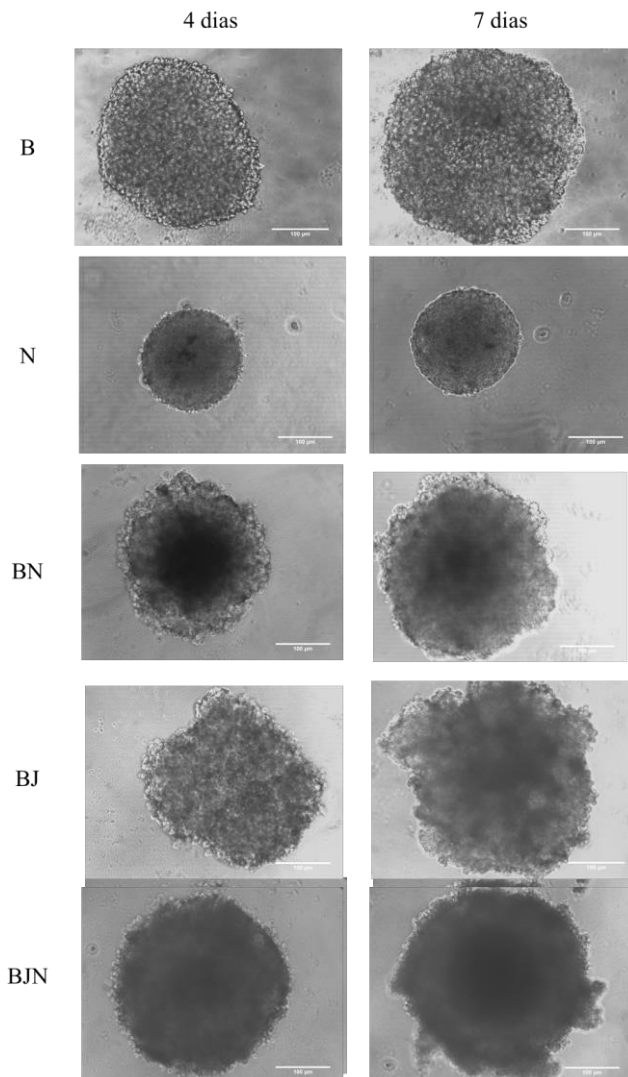
## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D

Após padronização do modelo 3D (concentração do gel e densidade celular), seguiu-se para a caracterização do mesmo, com o intuito de avaliar o tamanho, viabilidade, morfologia e perfil inflamatório das células presentes nos esferoides.

### 5.2.1 Estrutura e tamanho dos esferoides

Como pode ser observado na Figura 17, os esferoides obtidos nas cinco condições analisadas apresentam tamanhos e graus de compactação variados. Além disso, é possível notar um aumento aparente no tamanho dos esferoides no sétimo dia de cultivo em comparação ao quarto dia.

Figura 17 – Fotomicrografia representativa dos esferoides formados nas diferentes condições de cultura 3D no quarto e sétimo dia de cultivo

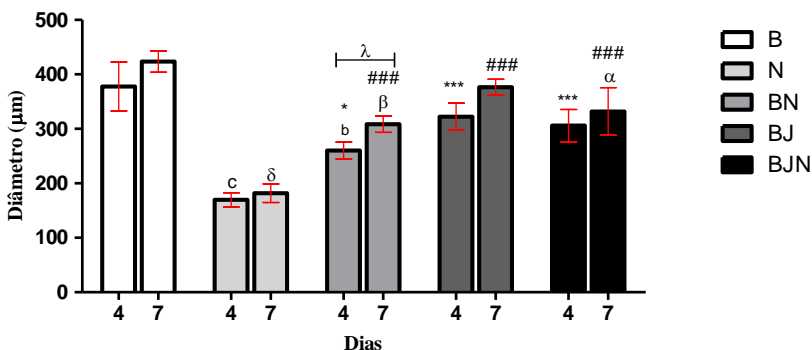


As imagens ilustram os esferoides formados pelo método 3D, nas diferentes condições escolhidas, no quarto e sétimo dia de cultivo. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BN = B16F10:NIH/3T3; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. Escala: 100  $\mu$ m.

O diâmetro dos esferoides foi determinado no quarto e sétimo dia de cultivo 3D para avaliar o tamanho dos esferoides em cada condição. Os resultados obtidos (Figura 18 e Tabela 1) indicam diferenças entre os heteroesferoides e os monoesferoides. O monoesferoide de B16F10 apresentou o maior diâmetro e o monoesferoide de NIH/3T3 apresentou o menor diâmetro em comparação com as outras condições em ambos os períodos analisados. Em contraste, os heteroesferoides apresentaram tamanho homogêneo em ambos os períodos avaliados.

De maneira geral, o diâmetro médio dos esferoides foi de 276  $\mu\text{m}$  no dia quatro e de 322  $\mu\text{m}$  no dia sete de cultivo 3D.

Figura 18 – Diâmetro dos esferoides nas diferentes condições de cultura 3D no quarto e sétimo dia de cultivo



Diâmetro dos esferoides no quarto (4) e sétimo (7) dias de cultivo 3D.  $n=3$ . Análise estatística por t-Student pareado e ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni.  $\lambda$  ( $p < 0,01$ ) em relação a condição BN do sétimo e quarto dia;  $c$  ( $p < 0,001$ ) em relação ao quarto dia de B;  $\delta$  ( $p < 0,001$ ) em relação ao sétimo dia de B;  $b$  ( $p < 0,01$ ) em relação ao quarto dia de B;  $\beta$  ( $p < 0,01$ ) em relação ao sétimo dia de B;  $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) em relação ao sétimo dia de B; \* ( $p < 0,05$ ) \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao quarto dia de N; ### ( $p < 0,001$ ) em relação ao sétimo dia de N. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.

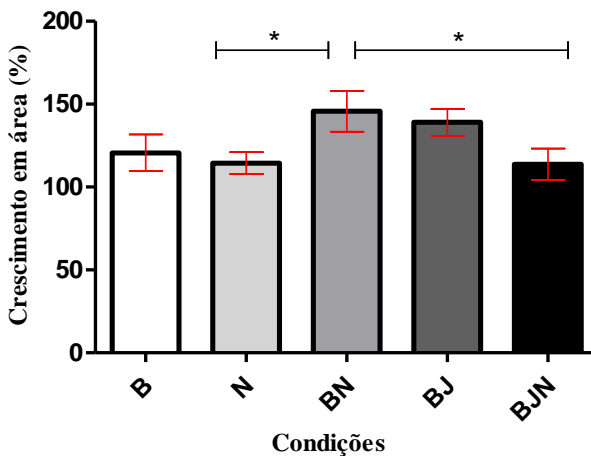
Tabela 1 – Diâmetro dos esferoides nas diferentes condições de cultura 3D no quarto e sétimo dia de cultivo.

	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	
	Dia 4	Dia 7
B	$380 \pm 45$	$420 \pm 20$
N	$170 \pm 13$	$180 \pm 17$
BN	$260 \pm 15$	$310 \pm 15$
BJ	$320 \pm 25$	$380 \pm 14$
BJN	$310 \pm 30$	$330 \pm 43$

Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

Após, foi realizada a análise da porcentagem do crescimento em área através dos valores em *pixels* obtidos no sétimo dia de cultivo 3D em relação ao quarto. A análise da porcentagem do crescimento em área dos esferoides revelou que a condição B16F10:NIH/3T3 obteve maior crescimento em área médio que as condições NIH/3T3 e B16F10:J774:NIH/3T3 (Figura 19 e Tabela 2).

Figura 19 – Crescimento dos esferoides nas diferentes condições de cultura 3D no sétimo dia de cultivo



Representação gráfica do crescimento em área dos esferoides (em porcentagem) por condição no sétimo dia de cultivo em comparação ao quarto dia (definido como 100%). n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. \* ( $p < 0,05$ ). Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.

Tabela 2 – Crescimento da área dos esferoides nas diferentes condições de cultura 3D no sétimo dia de cultivo

	Área (%)
B	21 ± 6
N	14 ± 6
BN	46 ± 7
BJ	39 ± 8
BJN	14 ± 9

Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3.

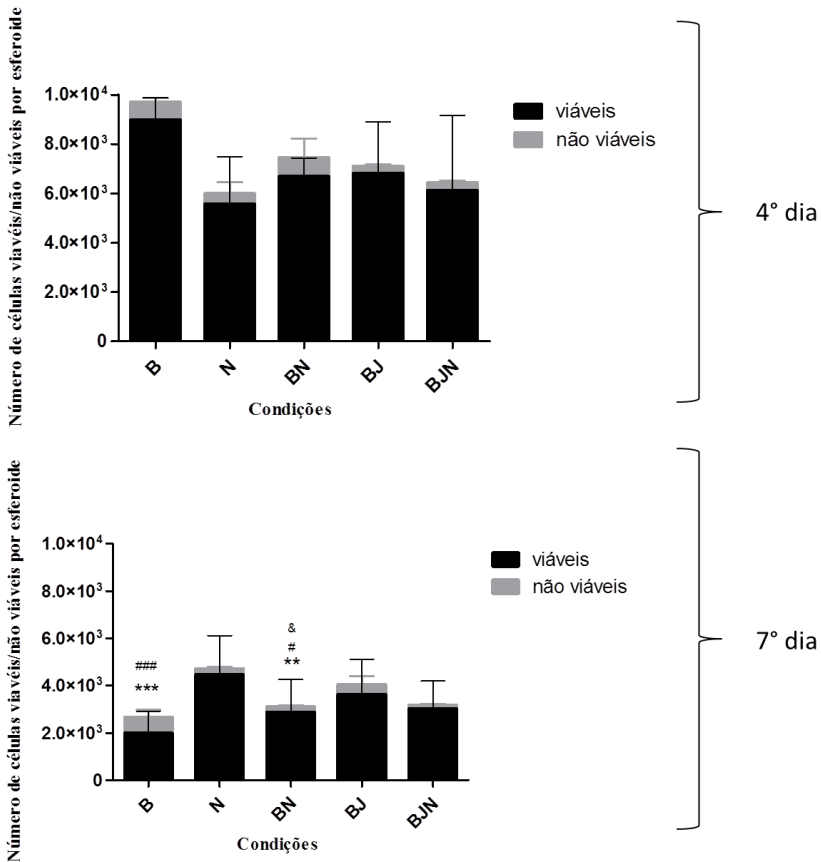
### 5.2.2 Número e viabilidade celular dos esferoides

Para averiguar o número estimado de células presentes por esferoide, as células foram quantificadas. Na Figura 20 e na Tabela 3,

estão apresentados os valores médios totais da contagem de células viáveis e não viáveis e também a porcentagem respectiva das células viáveis.

Houve a diminuição do número total de células (incluindo viáveis e não viáveis) em todas as condições no sétimo dia em relação ao quarto dia de cultivo 3D, principalmente para o monoesferoide de B16F10 e para o heteroesferoide de B16F10:NIH/3T3. Porém não foi observadas diferenças entre a viabilidade média em porcentagem do sétimo dia em relação ao quarto dia de cultivo 3D.

Figura 20 – Número e viabilidade celular dos esferoides no quarto e sétimo dia de cultivo 3D



O gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão do número de células viáveis, não viáveis e total contadas por esferoide em cada condição nos dias quatro e sete de cultivo 3D.  $n=3$ . Análise estatística por ANOVA de uma via para comparação entre as condições de um mesmo período e t-Student não pareado para comparação entre as mesmas condições em períodos diferentes. \*\*\* ( $p < 0,001$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ) em relação ao número total de células do dia quatro; ### ( $p < 0,001$ ) e # ( $p < 0,05$ ) em relação ao número de células viáveis dia quatro; & ( $p < 0,05$ ) em relação ao número de células não viáveis do dia quatro. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BN = B16F10:NIH/3T3; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.



Tabela 3 – Número e viabilidade celular dos esferoides no quarto e sétimo dia de cultivo 3D

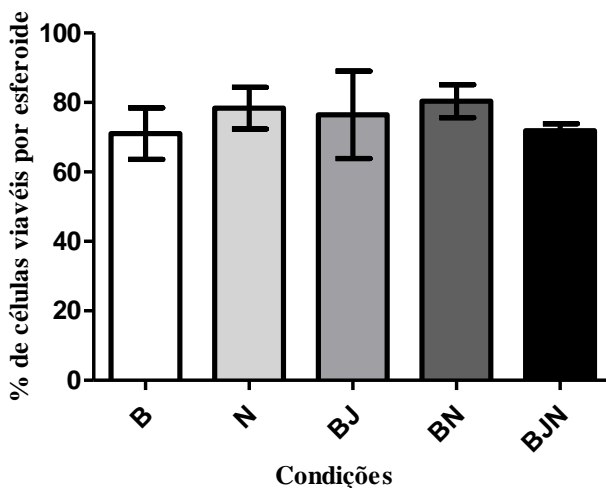
Dia 4				
	Total	Viáveis	Não viáveis	Viáveis (% média)
B	10500 ± 1250	8900 ± 920	720 ± 180	85
N	6000 ± 2280	5600 ± 1920	430 ± 400	93
BN	8000 ± 4250	6700 ± 740	770 ± 700	83
BJ	7700 ± 3080	6800 ± 2110	280 ± 90	88
BJN	6800 ± 3650	6100 ± 3040	310 ± 90	90
Dia 7				
	Total	Viáveis	Não viáveis	Viáveis (% média)
B	2200 ± 1080	2000 ± 940	280 ± 200	90
N	4700 ± 1750	4400 ± 1660	250 ± 90	94
BN	3000 ± 1550	2900 ± 140	230 ± 70	97
BJ	4000 ± 1850	3600 ± 1490	420 ± 360	90
BJN	3200 ± 1190	3000 ± 1170	140 ± 70	94

Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3.

A viabilidade das células presentes nos esferoides no sétimo dia de cultura 3D foi confirmada pelo ensaio da integridade de membrana por citometria de fluxo, em que as células foram marcadas com iodeto de propídio (IP), um marcador fluorescente. No Apêndice A encontram-se os *dot plots* e histogramas desta análise incluindo os controles e brancos.

No citômetro de fluxo foram adquiridos 10.000 eventos por condição. O valor médio calculado por células viáveis foi transformado em porcentagem e está representado na Figura 21 e na Tabela 4. Não houve diferenças entre a viabilidade celular de cada condição 3D e os esferoides apresentaram viabilidade entre 70 e 80 %.

Figura 21 – Viabilidade celular dos esferoides no sétimo dia de cultivo 3D



Porcentagem (média  $\pm$  desvio padrão) da viabilidade celular nas condições 3D após sete dias de cultivo.  $n=3$ . Análise estatística por ANOVA de uma via. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.

Tabela 4 – Viabilidade celular dos esferoides no sétimo dia de cultivo 3D

	Viabilidade (%)
B	71 $\pm$ 7
N	78 $\pm$ 6
BN	80 $\pm$ 5
BJ	76 $\pm$ 13
BJN	72 $\pm$ 2

Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ .

### 5.2.3 Morfologia celular

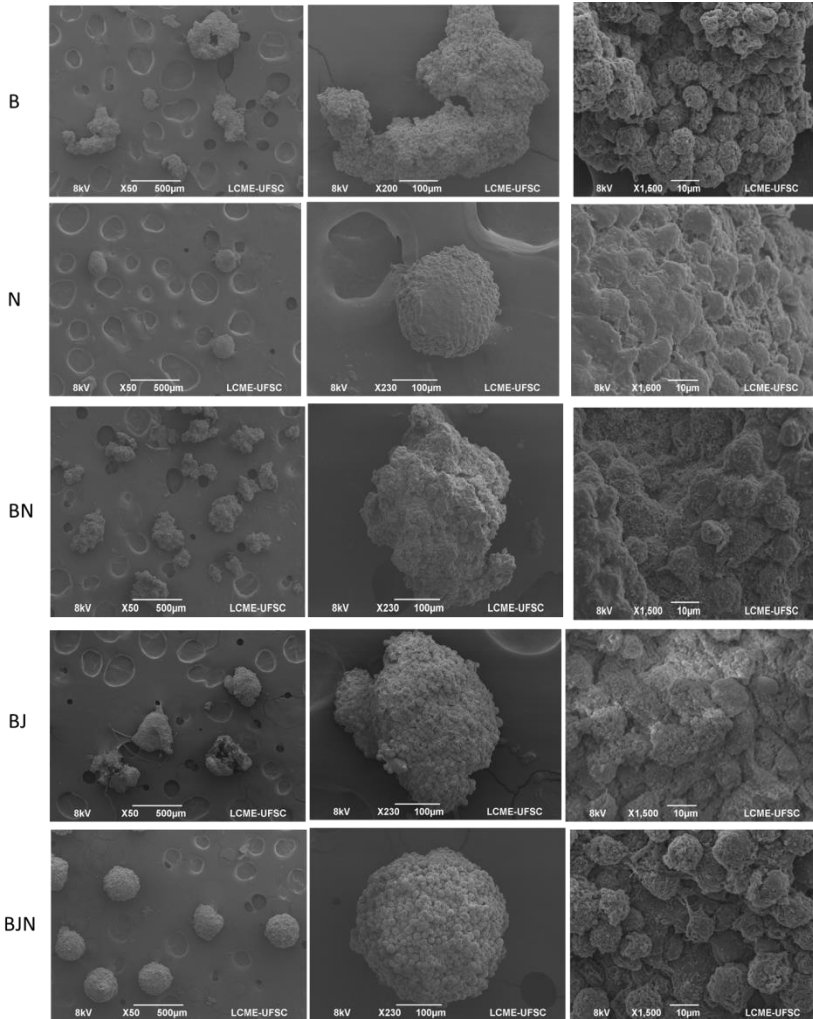
A análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura permite uma avaliação mais minuciosa da superfície de cada condição da cultura 3D. É possível notar interações célula-célula e célula-matriz extracelular, quando presente. A Figura 22 mostra as

imagens obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura das monos e co-culturas 3D. As imagens correspondem aos esferoides recolhidos no sétimo dia de cultivo.

A maioria das condições apresentaram uma superfície rugosa, em que as células podem ser vistas, exceto o monoesferoide de NIH/3T3 que apresentou uma superfície mais lisa. Nota-se que os esferoides contendo apenas a linhagem tumoral B16F10 apresentaram forma irregular e acabaram rompendo-se com a preparação da técnica, demonstrando serem mais frágeis, o mesmo ocorreu com as condições B16F10:NIH/3T3 e B16F10:J774. Já as condições contendo apenas NIH/3T3 e as três linhagens celulares juntas B16F10:J774:NIH/3T3 apresentaram-se mais compactas e firmes, mostrando que os esferoides continuaram em perfeita formação mesmo após as etapas de preparação da amostra para a técnica.

Em maior aumento, é possível notar em todas as condições a conexão celular e a presença de matriz extracelular. Não foi possível identificar cada linhagem por esta análise, pois as células aparentam semelhanças morfológicas quando em 3D.

Figura 22 – Análise morfológica dos esferoides por microscopia eletrônica de varredura

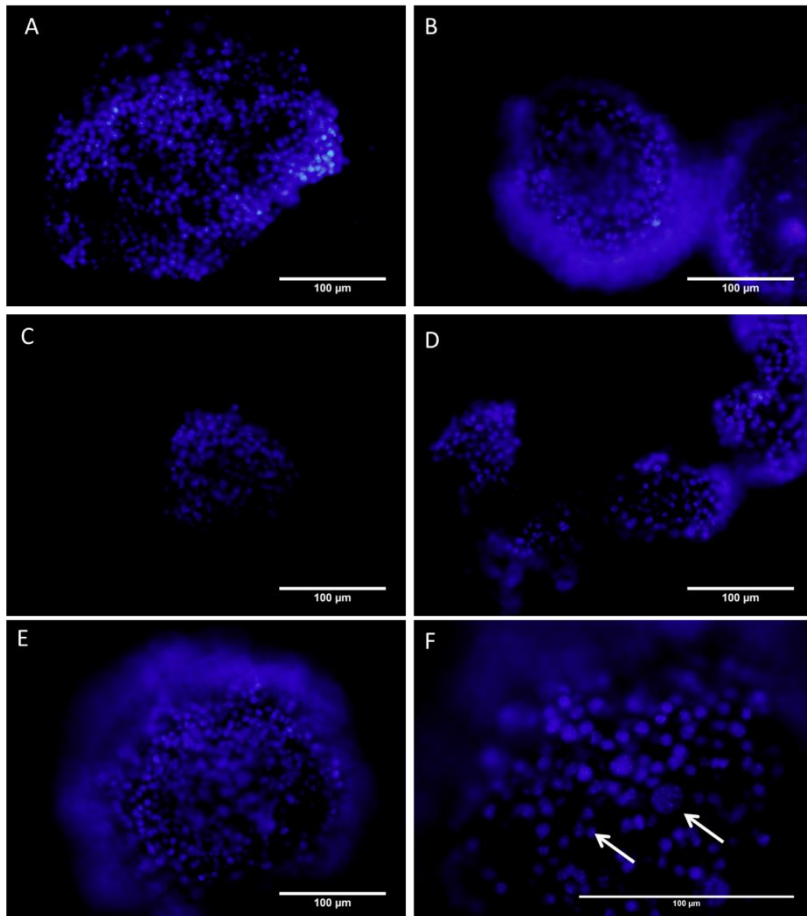


A figura ilustra diferenças na morfologia externa de cada condição. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.

A análise morfológica dos esferoides por microscopia de fluorescência marcados com DAPI mostra uma superfície com presença de espaços, sugestivos de ausência de células (Figura 23). Nota-se também que apenas o monoesferoide de NIH/3T3 e o heteroesferoide de

B16F10:J774:NIH/3T3 demonstraram forma esferoidal completa, com ausência de irregularidades. A cromatina em todos os esferoides apresenta-se compactada e os núcleos apresentam tamanhos heterogêneos no heteroesferoide formado pelas três linhagens celulares (Figura 23G).

Figura 23 – Análise morfológica dos esferoides por microscopia de fluorescência

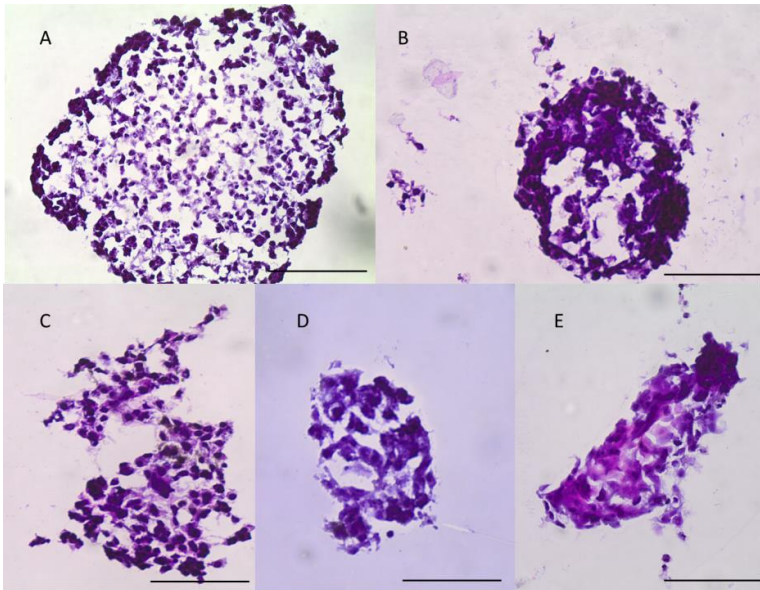


A figura ilustra a marcação do núcleo das células presentes no esferoides marcados com DAPI. Legenda: A) B16F10. B) NIH/3T3. C) B16F10:NIH/3T3. D) B16F10:J774. E) B16F10:J774:NIH/3T3. F) B16F10:J774:NIH/3T3 em maior aumento. Setas brancas indicam células com tamanho heterogêneo e cromatina condensada. Escala: 100 µm.

Após análise da morfologia externa por microscopia eletrônica de varredura, os esferoides foram analisados interiormente. Por criosecção, os esferoides foram alocados em lâminas silanizadas e corados com hematoxilina e eosina (HE). A Figura 24 ilustra as imagens obtidas desta análise.

A coloração por hematoxilina demonstra em roxo os núcleos celulares e a matriz extracelular, já a coloração por eosina em rosa, demonstra o citoplasma celular, matriz extracelular e colágeno, porém não foi tão expressa em todas as condições, sendo apenas mais aparente no heteroesferoide de B16F10:J774:NIH/3T3. É possível notar a presença de espaços vazios (em branco) no interior dos esferoides, indicando que eles não são completos por células e nem compactos no seu interior. Ao contrário, nota-se uma concentração de células nas bordas dos esferoides. Algumas condições ainda apresentam-se fragmentadas ao invés de esferoides uniformes, indicando certa fragilidade para a técnica.

Figura 24 – Análise morfológica dos esferoides por HE



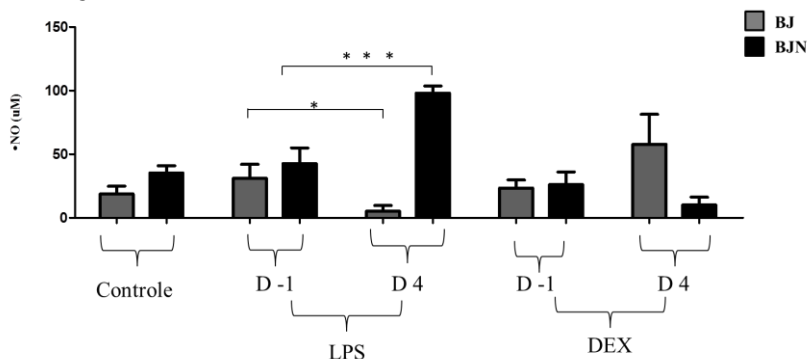
Esferoides das cinco diferentes condições 3D criosectados e corados com hematoxilina e eosina (HE). Legenda: A) B16F10. B) NIH/3T3. C) B16F10:NIH/3T3. D) B16F10:J774. E) B16F10:J774:NIH/3T3. Escala: 100  $\mu$ m.

#### 5.2.4 Perfil inflamatório

Para finalizar a caracterização do modelo celular 3D, o perfil inflamatório dos macrófagos polarizados presentes nos esferoides foi determinado. A polarização dos macrófagos em M1 (pró-inflamatório/ antitumoral) e M2 (anti-inflamatório/ pró-tumoral), para a padronização de um perfil inflamatório nos esferoides, foi induzida em dois tempos: 1) 24 horas antes do cultivo 3D somente na linhagem macrófágica e 2) no dia quatro de cultivo em todas as condições 3D. A análise do perfil inflamatório foi realizada determinado  $\text{NO}$  (nitrito/nitrato) e interleucina-6 (IL-6), ambas substâncias inflamatórias/antitumorais, no sobrenadante dos esferoides após sete dias de cultivo 3D. Os resultados obtidos indicam algumas diferenças no perfil de liberação entre as condições de culturas 3D. As curvas analíticas bem como equações de reta encontram-se no Apêndice B.

Na determinação de  $\text{NO}$  das condições que possuem macrófagos em sua constituição, ou seja B16F10:J774 e B16F10:J774:NIH/3T3, nota-se que ambas as condições produzem concentrações semelhantes de  $\text{NO}$  sem a presença de um agente polarizador (grupo controle). Além disso nota-se diferenças de concentrações de  $\text{NO}$  produzidos pelas condições, usando a mesma substância polarizadora, porém em momentos distintos da polarização, principalmente com LPS ( Figura 25 Tabela 5)

Figura 25 – Determinação de  $\dot{\text{NO}}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que possuíam macrófagos



A adição de LPS (lipolissacarídeo) e DEX (dexametasona) ocorreu em dois momentos: D -1) somente na linhagem macrófagica 1 dia antes do início da cultura 3D; D 4) nas condições que possuíam macrófagos em sua constituição no dia 4 de cultivo 3D. n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via para comparação entre as condições de um mesmo período e t-Student não pareado para comparação entre as mesmas condições em períodos diferentes. \* (p < 0,05); \*\*\* (p < 0,001). Legenda: Controle: sem agente polarizador. BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.

Tabela 5 – Determinação de  $\dot{\text{NO}}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que possuíam macrófagos

	$\dot{\text{NO}}$ (µM)				
	Controle	LPS		DEX	
			Dia -1	Dia 4	Dia -1
BJ	19 ± 6	31 ± 1	5 ± 4	24 ± 6	58 ± 24
BJN	35 ± 2	43 ± 2	98 ± 6	26 ± 2	10 ± 6

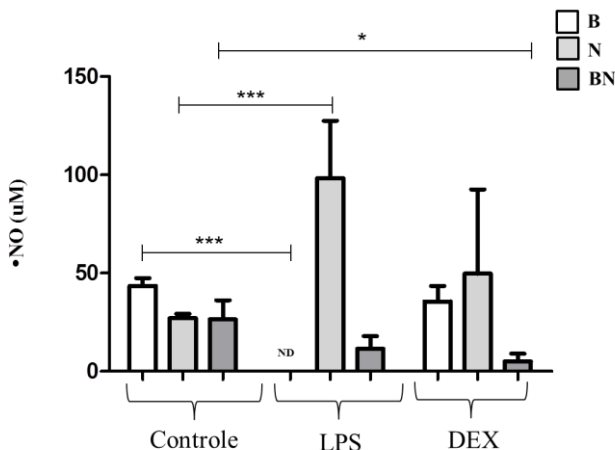
Legenda: BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3.

A polarização no dia 4 do cultivo 3D ocorreu em todas as condições, por isso é possível notar no gráfico da Figura 26 e Tabela 6 em que LPS e DEX estimulam também a produção de  $\dot{\text{NO}}$  nas condições sem a presença de macrófagos (B16F10, NIH/3T3 e B16F10:NIH/3T3). Em comparação com o grupo controle houve



diferença na produção de  $\cdot\text{NO}$  do monoesferoide de B16F10, este diminuiu a produção de  $\cdot\text{NO}$  com adição de LPS a concentrações não detectáveis. O monoesferoide de NIH/3T3 apresentou elevada produção de  $\cdot\text{NO}$  com adição de LPS. O heteroesferoide de B16F10/NIH/3T3 apresentou diminuição da produção de  $\cdot\text{NO}$  na estimulação com DEX. Portanto, para que não houvesse produção cruzada de  $\cdot\text{NO}$  pelas outras linhagens celulares, decidiu-se polarizar somente a linhagem macrófágica no dia -1 do cultivo 3D. As três condições também apresentaram semelhantes concentrações de  $\cdot\text{NO}$  produzidas sem a presença de um agente polarizador (grupo controle).

Figura 26 – Determinação de  $\cdot\text{NO}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que não possuíam macrófagos



Para avaliar se as substâncias polarizadoras estimulavam as condições sem macrófagos, estas foram estimuladas no quarto dia de cultivo 3D com LPS (lipopolissacarídeo) e DEX (dexametasona).  $n=3$ . Análise estatística por *t*-Student não pareado para comparação entre as mesmas condições em períodos diferentes. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Legenda: Controle: sem agente polarizador. B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3. ND = Não detectável.

Tabela 6 - Determinação de  $\cdot\text{NO}$ , após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que não possuíam macrófagos

	$\cdot\text{NO}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	Controle	LPS	DEX
		Dia 4	Dia 4
B	44 $\pm$ 4	ND	36 $\pm$ 8
N	27 $\pm$ 2	98 $\pm$ 29	50 $\pm$ 43
BN	26 $\pm$ 10	12 $\pm$ 6	5 $\pm$ 4

Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. ND = não detectável. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

A determinação de interleucina-6 (IL-6) no sobrenadante celular das condições com os macrófagos polarizados no dia anterior ao início do cultivo 3D (dia -1) ocorreu pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Na Tabela 7, estão apresentados os dados referentes a produção de IL-6 das diferentes condições 3D na ausência ou presença das substâncias polarizadoras LPS e DEX.

Tabela 7 – Determinação de IL-6, após adição de agentes polarizadores, no sobrenadante do sétimo dia de cultivo 3D nas condições que possuíam macrófagos

	IL-6 (pg/ml)		
	Controle	LPS	DEX
B	ND	-	-
N	13000 ± 3000 <sup>***</sup>	-	-
BN	4400 ± 380 <sup>###</sup>	-	-
BJ	160 ± 1 <sup>###</sup>	350 ± 50	3 ± 6
BJN	6600 ± 1900 <sup>*#a</sup>	10600 ± 1900 <sup>bbb</sup>	1800 ± 1600 <sup>ccc</sup>

A adição de LPS (lipopolissacarídeo) e DEX (dexametasona) ocorreu somente na linhagem macrófágica no dia anterior (-1) ao início do cultivo 3D. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. \* ( $p < 0,05$ ) \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao monoesferoide de B16F10; # ( $p < 0,05$ ) ### ( $p < 0,001$ ) em relação ao monoesferoide de NIH/3T3; <sup>a</sup> ( $p < 0,05$ ) em relação ao heteroesferoide de B16F10:J774; <sup>bbb</sup> ( $p < 0,001$ ) em relação ao heteroesferoide de B16F10:J774 com LPS; <sup>ccc</sup> ( $P < 0,001$ ) em relação ao heteroesferoide de B16F10:J774:NIH3T3 com LPS. Controle: sem agente polarizador. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BN = B16F10:NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774. ND = não detectável. Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3.

O monoesferoide constituído de B16F10 não foi capaz de produzir IL-6. Diferentemente, o monoesferoide de NIH/3T3 obteve a maior produção de IL-6 entre as diferentes condições 3D sem a presença de um agente polarizador (grupo controle).

As condições que possuíam macrófagos quando estimuladas com LPS, apresentaram um aumento na produção de IL-6 em relação ao controle, e uma diminuição na produção desta citocina com a estimulação com DEX, em relação a produção com LPS. Com este resultado de IL-6, confirma-se a polarização em M1 com LPS (aumento da produção de IL-6) e M2 com DEX (diminuição da produção de IL-6) dos macrófagos. Também fica estabelecido o perfil de liberação de NO e IL-6 pelos macrófagos, fibroblastos e melanoma nos monos e heteroesferoide polarizados ou não.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CULTURA 3D COM O SAL DE ISOTIOURÔNIO MF03

Após padronização e caracterização do modelo celular 3D, seguiu-se para a avaliação da citotoxicidade do sal de isotiourônio MF03 no modelo. Para esta análise, foram selecionados os monoesferoides de B16F10 e NIH/3T3 e apenas o heteroesferoide de B16F10:J774:NIH/3T3.

Neste ensaio, utilizou-se como padrão para comparação com o sal de isotiourônio MF03, o primeiro fármaco aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de melanoma metastático, a dacarbazina (SULLIVAN; LORUSSO; FLAHERTY, 2013).

Os resultados apontam diferenças nas concentrações das  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50 % das células) entre o composto MF03 e a dacarbazina conforme a Tabela 8. Também há diferenças entre as condições 3D com o mesmo composto. As curvas de concentração-resposta encontram-se no Apêndice C. A  $CC_{50}$  média do MF03 foi menor no monoesferoide de B16F10 em comparação ao monoesferoide de células não-tumorais (NIH/3T3). Essa diferença, embora menor, também foi observada para a dacarbazina. Em todas as condições avaliadas, o composto MF03 apresentou valores de  $CC_{50}$  inferiores quando comparado a dacarbazina. Notou-se também a diminuição do valor da  $CC_{50}$  tanto da dacarbazina quando do MF03 na condição com as três linhagens juntas (B16F10:J774:NIH/3T3) em relação a condição do monoesferoide tumoral (B16F10).

Tabela 8 -  $CC_{50}$  nas condições 3D

	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)	
	Dacarbazina	MF03
B	2800 $\pm$ 1000	130 $\pm$ 20 <sup>###</sup>
N	3700 $\pm$ 670	1700 $\pm$ 270 <sup>*</sup>
BJN	1500 $\pm$ 500	50 $\pm$ 10 <sup>###</sup>

$CC_{50}$  avaliada pelo método da fosfatase ácida (APH). Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. \* ( $p < cv$  0,05) em relação à condição B com MF03. ### ( $p < 0,001$ ) em relação às mesmas condições com dacarbazina. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BJN = B16F10:J774:NIH/3T3. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

Para efeitos de comparação entre os dados de citotoxicidade obtidos nos modelos de cultura celular 3D e 2D, os resultados quantitativos estão sendo mostrados na Tabela 9. As curvas de concentração-resposta no modelo 2D encontram-se no Apêndice D.

Tabela 9 – Comparação da  $CC_{50}$  das culturas 2D e 3D na linhagem de melanoma

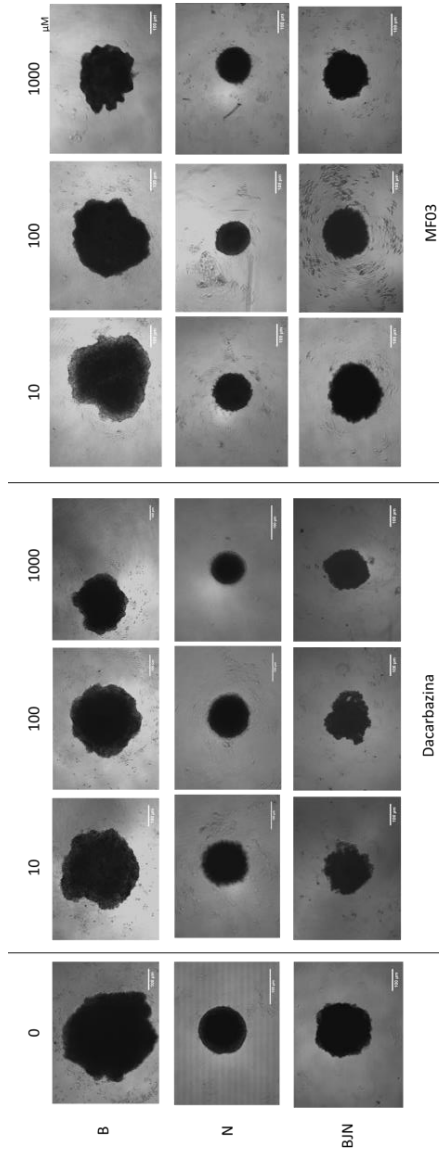
B16F10		
$CC_{50}$ ( $\mu$ M)		
	2D	3D
Dacarbazina	$870 \pm 70^{**}$	$2800 \pm 1000$
MF03	$10 \pm 2^*$	$130 \pm 20$

$CC_{50}$  avaliada pelo método da fosfatase ácida (APH). Análise estatística por t-Student entre os modelos 2D e 3D. \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ) em relação ao modelo 3D com MF03 e dacarbazina, respectivamente. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ .

Os resultados obtidos demonstraram diferença entre as  $CC_{50}$  nos modelos 2D e 3D com o sal de isotiourônio MF03 e com a dacarbazina. Nota-se um aumento no valor da  $CC_{50}$  tanto da dacarbazina como do sal de isotiourônio MF03 no modelo 3D em relação ao modelo 2D.

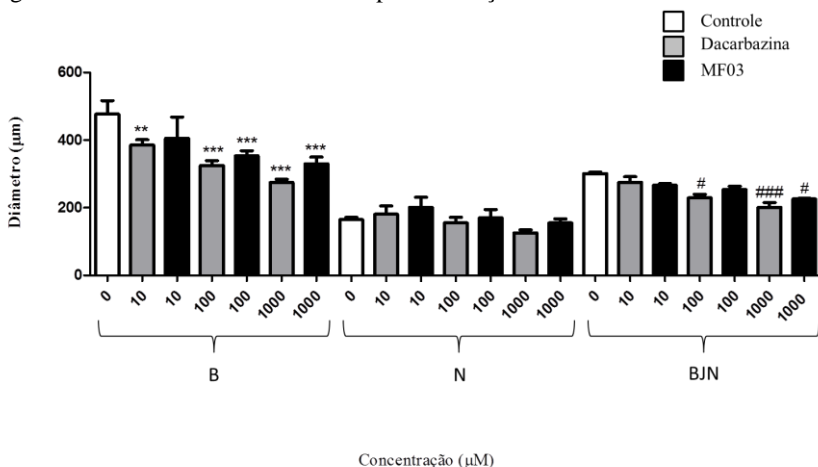
O diâmetro dos esferoides foi determinado antes e após as incubações com o sal de isotiourônio MF03 e com a dacarbazina nas concentrações de 0, 10, 100 e 1000  $\mu$ M, para comparação e avaliação dos efeitos citotóxicos. É possível perceber que com o aumento da concentração dos compostos ocorre a diminuição do diâmetro dos esferoides em relação ao controle principalmente no monoesferoide de B16F10 e em concentrações maiores de dacarbazina e MF03 no heteroesferoide de B16F10:J774:NIH/3T3. Não houve diminuição do diâmetro do monoesferoide de NIH/3T3 com o aumento das concentrações de dacarbazina e MF03 em relação ao controle (Figura 27, 28 e Tabela 10).

Figura 27 – Fotomicrografia representativa dos esferoides após incubação com dacarbazina e MF03



As imagens ilustram os esferoides 3D após incubação com dacarbazina e MF03 nas concentrações 0, 10, 100 e 1000 µM. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; B/N = B16F10:NIH/3T3:J774. Escala: 100 µm.

Figura 28 – Diâmetro dos esferoides após incubação com dacarbazina e MF03



O diâmetro foi determinado no último dia de incubação (sétimo dia).  $n=3$ . Análise estatística ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. \*\* ( $p < 0,01$ ) \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle (0 µM) de B; # ( $p < 0,05$ ) ### ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle de BJN. Legenda: B = B16F10; N = NIH/3T3; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.

Tabela 10 – Diâmetro dos esferoides após incubação com dacarbazina e MF03

B16F10		
Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	
	Dacarbazina	MF03
0	480 $\pm$ 40	480 $\pm$ 40
10	380 $\pm$ 16	400 $\pm$ 62
100	320 $\pm$ 14	350 $\pm$ 15
1000	270 $\pm$ 10	330 $\pm$ 20

NIH/3T3		
Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	
	Dacarbazina	MF03
0	160 $\pm$ 7	160 $\pm$ 7
10	180 $\pm$ 24	200 $\pm$ 30
100	150 $\pm$ 16	170 $\pm$ 25
1000	120 $\pm$ 8	150 $\pm$ 12

B16F10:J774:NIH/3T3		
Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	
	Dacarbazina	MF03
0	300 $\pm$ 4	300 $\pm$ 4
10	270 $\pm$ 16	270 $\pm$ 4
100	220 $\pm$ 10	250 $\pm$ 10
1000	200 $\pm$ 14	220 $\pm$ 2

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3.



## 6 DISCUSSÃO

O microambiente tumoral serve como uma ferramenta auxiliando na resistência aos tratamentos, e na migração e invasividade das células tumorais (TREDAN et al., 2007). Estudos *in vitro* devem considerar o estroma tumoral em suas pesquisas, e para uma melhor simulação do microambiente tumoral, a co-cultura tridimensional (3D) é indicada (ZIETARSKA et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de co-cultura tumoral 3D para mimetizar um microambiente tumoral. Para isso, utilizamos como modelo de câncer o melanoma. O melanoma foi escolhido, pois o tratamento para este tipo de câncer, o qual, entre as neoplasias de pele, possui o pior prognóstico, permanece ainda como desafio para a ciência de novos tratamentos (WHO, 2017a).

A linhagem tumoral escolhida para o modelo de melanoma foi a B16F10, uma linhagem murina bem estabelecida a qual foi utilizada nos experimentos de cultura bidimensional (2D) de Cisilotto et al (2015) com o sal de isotiourônio MF03. Estas escolhas foram feitas também por não haver na literatura nenhum relato de co-cultura 3D com esta linhagem associada aos macrófagos (J774) e fibroblastos (NIH/3T3) murinos até o fechamento deste estudo. O número de populações escolhidas foi baseado no estudo de Rama-Esendagli et al. (2014), o qual associou à célula tumoral de mama as linhagens de fibroblastos e macrófagos para análise da relação tumoral ao estroma celular. Goers et al. (2014) relatam que à medida que o número de populações aumenta a complexidade e instabilidade da cultura também aumentam, por estas razões, há poucos estudos utilizando três linhagens celulares.

Além disso, a proporção de cada linhagem celular escolhida nesse trabalho foi de 1:1 e 1:1:1 para as co-culturas, pois mostrou-se eficiente na formação de esferoides. A proporção de fibroblastos com macrófagos, para simular a proporção tumoral, dá suporte à formação do esferoide (RAMA-ESENDAGLI et al., 2014).

O modelo escolhido para a execução deste trabalho foi o esferoide tumoral multicelular 3D (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Este modelo representa e mimetiza morfológica e funcionalmente o microambiente tumoral (KUNZ-SCHUGHART et al., 2004). Para execução desse modelo, utilizou-se a estratégia de recobrir uma placa de 96 poços com gel de agarose, a qual impede a aderência das células ao fundo da placa. No estudo de Carlsson; Yuhás (1984), foi considerado que a agarose forma uma superfície semi-sólida e não-aderente apropriada para o cultivo de

esferoides. A primeira tentativa, utilizando agarose em uma concentração de 1,5 %, como no estudo mencionado, não foi capaz de formar esferoides únicos por poço. Assim, optou-se em aumentar a concentração do gel para 2 % com o intuito de tentar diminuir a interação celular com o gel de agarose. Esta condição apresentou resultados satisfatórios como visto na Figura 14. Segundo Ravi et al. (2015), o gel de agarose é de simples e fácil uso para formar esferoides em culturas 3D, porém cada cultura 3D (dependendo das linhagens celulares utilizadas) exige diferentes concentrações de agarose.

A concentração celular também foi outro fator decisivo para a formação de esferoides únicos. Na primeira tentativa, foi utilizada uma densidade celular baixa de  $3 \times 10^5$  células/poço. No entanto, nestas condições, após sete dias de cultivo, não houve a formação de esferoides e as células ficaram apenas em suspensão espalhadas pelo poço. Na segunda densidade celular testada ( $1,2 \times 10^4$  células/poço), após o cultivo de quatro dias, as células formaram esferoides e permaneceram assim até o sétimo dia de cultivo 3D (Figura 15). Dependendo das linhagens celulares, uma baixa densidade celular pode impedir a formação de esferoides na cultura 3D, bem como interferir na comunicação célula - célula (BATES; EDWARDS; YATES, 2000; STEPHAN; JOHNSON; ROBERTS, 2011).

Para desenvolver o modelo, planejou-se inicialmente elaborar seis condições de cultivo 3D: melanoma, macrófago, fibroblastos, melanoma : fibroblastos, melanoma : macrófagos e melanoma : macrófagos : fibroblastos, a fim de avaliar possíveis diferenças estruturais e funcionais entre elas em função das diferenças celulares. Porém, a condição contendo apenas a linhagem celular macrofágica não apresentou formação de esferoide (Figura 16), ficando as células apenas aglomeradas ao centro do poço. Isto pode ter ocorrido pelo mecanismo de adesão via proteoglicanos que os macrófagos possuem, os quais apenas aderem-se à matriz extracelular não possibilitando a adesão macrófago – macrófago (SANTIAGO-GARCI; KODAMA; PITAS, 2003).

Assim, as cinco condições capazes de formar esferoides foram avaliadas em relação ao tamanho do sétimo dia em comparação ao quarto dia de cultivo 3D. Embora tenha sido observado um aumento aparente no tamanho dos esferoides (Figura 17) isto apenas foi significativo na condição B16F10:NIH/3T3 (Figura 18 e 19). Segundo Sutherland (1988), esferoides tumorais multicelulares possuem uma fase inicial de crescimento celular seguido de uma fase estacionária, como nos tumores sólidos. Isto indica que as células crescem até o quarto dia

de cultivo 3D e após estacionam. Porém, notou-se grande diferença de tamanho entre os monos e heteroesferoides. O monoesferoide de melanoma apresentou o maior diâmetro e o monoesferoide de fibroblastos o menor diâmetro entre as condições, já os heteroesferoides não apresentaram diferenças de diâmetro entre eles. Um dos primeiros estudos utilizando o modelo de co-cultura 3D demonstrou que, com o passar dos dias, a tendência é que o diâmetro dos esferoides de linhagens tumorais aumente, podendo chegar ao valor de quase 800  $\mu\text{m}$  (YUHAS et al., 1977). As linhagens não tumorais geralmente apresentam esferoides com diâmetros inferiores quando comparados com os diâmetros dos esferoides produzidos por uma linhagem tumoral (RAMA-ESENDAGLI et al., 2014). Neste trabalho o diâmetro médio do monoesferoide da linhagem tumoral foi de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ , já o monoesferoide da não tumoral 180  $\mu\text{m}$  e dos heteroesferoides 310  $\mu\text{m}$ .

O tamanho dos esferoides tem influência direta na viabilidade celular, sendo caracterizado por duas fases. A fase inicial de crescimento celular é caracterizada pela agregação e proliferação celular. A fase estacionária representa a não proliferação celular seguido da formação de um centro necrótico, causado pelo tamanho do esferoide (> 200 – 300  $\mu\text{m}$ ), o qual dificulta a chegada de nutrientes e oxigênio ao centro do esferoide, assim a viabilidade celular é mais afetada no centro do esferoide. A necrose neste caso acontece pelas alterações da tensão de oxigênio, glicose, lactato e concentração de ATP (HAMILTON, 1998; SANTINI; RAINALDI, 1999). Neste trabalho, os esferoides diminuíram o número de células no sétimo dia de cultivo em relação ao quarto dia (Figura 20), embora cerca de 75 % das células presentes nos esferoides estavam viáveis no sétimo dia (Figura 21). Além disso, muitas células morreram e desprenderam-se dos esferoides. Hipóxia e privação de nutrientes podem ter sido a causa para isto, considerando o tamanho dos esferoides obtidos. A mesma porcentagem média de viabilidade celular, de 75 %, foi encontrada no estudo de Amann et al., (2014) utilizando o mesmo modelo de cultura 3D, porém com linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas associadas a fibroblastos. Em uma pesquisa utilizando células tumorais de mama na formação dos esferoides foi verificado que com o passar dos dias houve aumento de proliferação celular (TALUKDAR et al., 2011). Outra pesquisa utilizando células epiteliais demonstrou diminuição do tamanho do esferoide e da viabilidade celular em sete dias de cultivo 3D (SATO et al., 2016). Especificamente, a linhagem tumoral de melanoma B16F10 agrega-se e prolifera nos três primeiros dias de cultura 3D e, após este

período, o número celular diminui e as células começam a morrer (GOUNDIAM; NAGEL; VAYSSADE, 2010). Estes estudos demonstram que a viabilidade e o crescimento esferoidal são dependentes das características específicas das linhagens celulares utilizadas, e de como elas comportam-se em situações de hipóxia e privação de nutrientes, associadas ou não a outras células.

A diminuição do número total de células causada neste modelo pode ser confirmada pela morfologia celular. A análise da morfologia celular interna com hematoxilina e eosina e com a marcação de DAPI confirmam grandes espaços vazios no interior dos esferoides enquanto a maioria das células está concentrada na periferia (Figura 23 e 24). Neste sentido, foi relatado que a falta de nutrientes como glicose e lactato causam a morte celular no interior dos esferoides mostrando imagens semelhantes às obtidas neste trabalho, nas quais podem ser observados espaços vazios (STEPHAN; JOHNSON; ROBERTS, 2011). A histologia com H&E do trabalho de Amann et al. (2014) mostra que os espaços vazios no interior dos esferoides aumentam com o passar dos dias tanto na monocultura tumoral quanto nas condições de co-cultura em decorrência da morte celular.

Como pode ser visto na Figura 17, os esferoides formados apresentam diferenças morfológicas entre cada condição de cultivo 3D, dependendo da linhagem celular envolvida, o grau de compactação celular é maior ou menor. Além disso, a morfologia varia também em uma mesma condição do quarto ao sétimo dia de cultivo 3D. A microscopia de varredura confirma estes achados mostrando que a compactação celular é dependente da linhagem utilizada (Figura 22). Pode-se notar irregularidades na formação do monoesferoide tumoral e dos heteroesferoides constituído de duas linhagens. Apenas o monoesferoide de fibroblastos e o heteroesferoide com as três linhagens foram capazes de formar uma estrutura esferoidal regular e compacta, não ocorrendo rompimentos aparentes. A maioria das superfícies dos esferoides apresentou rugosidade, apenas o monoesferoide da linhagem fibroblástica apresentou-se mais liso, podendo ser explicado pela maior produção de matriz extracelular. Os fibroblastos conferem rigidez para a arquitetura esferoidal aumentando o nível de similaridade com tumores sólidos *in vivo* (JEONG et al., 2016). É possível também nesta análise, a observação das interações célula-célula, bem como prolongamentos celulares, e célula-matriz extracelular, pela presença de filamentos na superfície celular. Os filamentos presentes na superfície das células possuem características de componentes da matriz extracelular. Nederman et al., (1984) concluiu em seu estudo que, além de

fibroblastos produzirem componentes da matriz extracelular, a célula tumoral também é capaz de produzir alguns componentes como colágeno e fibronectina. Neste sentido, em nenhum dos métodos utilizados para avaliação da morfologia dos esferoides no presente estudo foi possível identificar e distinguir cada linhagem celular presente nos heteroesferoides.

Outro ponto importante a ser considerado é a modulação do microambiente tumoral pelos macrófagos polarizados. Além de servir como um teste complementar para a confirmação da polarização dos macrófagos em M1 e M2, o perfil de citocinas e produção de óxido nítrico (\*NO) auxilia na avaliação de possíveis alterações inflamatórias celulares a partir de um perfil padrão de liberação de citocinas. Assim, é possível comparar se houve ou não mudanças neste perfil quando as células são submetidas a algum tipo de tratamento. Considera-se que somente macrófagos polarizados M1 liberam altas quantidades de \*NO e interleucina-6 (IL-6) no sobrenadante celular (MANTOVANI et al., 2002).

No melanoma, há grande quantidade de macrófagos, os quais possuem a capacidade de alterar o fenótipo de M1 para M2, porém a relação M1/M2 ainda não encontra-se clara. O que se sabe é que macrófagos M2 geralmente são encontrados em regiões de hipóxia no tumor (CHEN et al., 2011).

Os macrófagos associados ao tumor (MATs) assumem um perfil semelhante ao fenótipo M2. Assim sendo, a diminuição da produção de \*NO aumenta a proliferação celular tumoral e induz a falta de resposta das células T (TRAVÉS; LUQUE; HORTELANO, 2012). Calorini et al., (2005) evidenciaram que o contato físico por si só de macrófagos com células tumorais é capaz de gerar um aumento da produção de \*NO. Porém, a alta produção de \*NO por fibroblastos é independente de contato.

Neste trabalho, observou-se que todas as condições, mono ou heteroesferoides, produziram \*NO mesmo sem a presença do agente polarizador em quantidades semelhantes. Neste caso, não houve aumento na produção de \*NO quando os macrófagos estavam em contato com as células tumorais. Percebeu-se que adicionar os agentes polarizadores no quarto dia de cultivo 3D em todas as condições, também causou a modulação da linhagem tumoral, que diminuiu a concentração não detectáveis a produção de \*NO quando estimulada por LPS, e da fibroblástica a qual aumentou consideravelmente sua produção de \*NO quando estimulada por LPS (Figuras 25 e 26). Segundo Espanol et al. (2014), a linhagem fibroblástica NIH/3T3

estimulada por LPS associado ao interferon – gama (IFN- $\gamma$ ) produz um aumento de  $^*NO$  causado pela ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Como o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil inflamatório apenas oriundo da estimulação e polarização da linhagem macrófágica, foi decidido determinar tal perfil no sobrenadante dos esferoides que possuíam os macrófagos os quais foram polarizados 24 horas antes do cultivo 3D (B16F10:J774 e B16F10:J774:NIH/3T3). Porém não houve diferença entre a produção de  $^*NO$  com LPS em comparação ao controle e com DEX em comparação a estimulação com LPS.

Após ser definido o momento ideal da polarização macrófágica, foi escolhido avaliar a produção de interleucina-6 (IL-6, citocina pró-inflamatória) para confirmar a polarização dos macrófagos, e assim do perfil inflamatório. Esta citocina além de ser produzida por macrófagos é também produzida por fibroblastos, que no tumor tem como objetivo o recrutamento de macrófagos (COMITO et al., 2013). Quando liberada por macrófagos, a citocina IL-6 possui ação citotóxica (BERGAMIN et al., 2012). No presente estudo, foi confirmada a produção de IL-6 pelos fibroblastos quando isolados ou em co-cultivo com a célula tumoral, como também nos macrófagos (Tabela 7). A célula tumoral de melanoma isolada (monoesferoide) não produziu concentrações detectáveis de IL-6. Após polarização com LPS, é possível notar o aumento da produção de IL-6 e a diminuição da mesma quando com DEX no heteroesferoide de B16F10:J774 e B15F10:J774:NIH/3T3, assumindo assim característica de perfil inflamatório clássico de macrófagos M1 e M2.

O uso do modelo tumoral multicelular 3D *in vitro* serve como uma ferramenta de aproximação ao modelo *in vivo* para avaliar a entrega e a eficácia de novos fármacos com possíveis propriedades antitumorais (MEHTA et al., 2012). A dacarbazina é o fármaco utilizado como tratamento padrão para o melanoma maligno desde 1975 (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009), e por isso ela foi utilizada neste estudo para comparação com o composto MF03. O sal de isotiourônio MF03 foi um dos três sais que demonstraram citotoxicidade para diversas linhagens de melanoma, inclusive para a B16F10, no estudo de Cisilotto et al (2015).

No presente estudo, a avaliação da concentração citotóxica para 50 % (CC<sub>50</sub>) das células nos esferoides demonstrou que uma concentração relativamente inferior de MF03 foi necessária para ser citotóxica em relação à dacarbazina. Além disso, o composto MF03 apresentou-se mais seletivo para a linhagem tumoral (monoesferoide de

B16F10) do que para a linhagem não tumoral fibroblástica (monoesferoide de NIH/3T3). Curiosamente, a  $CC_{50}$  do sal MF03 no heteroesferoide com as três linhagens celulares (B16F10:J774:NIH/3T3) foi inferior a do monoesferoide tumoral. De acordo com Choi et al., (2013), uma das estratégias para aumentar a eficácia terapêutica é utilizar compostos que destruam os componentes estromais do tumor (como fibroblastos e MATs) ou até mesmo o que eles produzem, como as proteínas da matriz extracelular. Pela  $CC_{50}$  inferior do MF03 quando as três linhagens celulares formam o heteroesferoide, sugere-se que o composto possa interferir nas barreiras físicas do esferoide tumoral, como as interações célula-célula ou célula-matriz extracelular. Porém, mais análises deverão ser realizadas para confirmação.

Adicionalmente, quando compara-se a  $CC_{50}$  do MF03 para a linhagem B16F10 obtida com o modelo de monocultura celular 2D ( $10 \pm 2 \mu\text{M}$ ) com a  $CC_{50}$  neste modelo 3D ( $130 \pm 20 \mu\text{M}$ ), observa-se um aumento de treze vezes deste parâmetro entre os modelos. Já, quando compara-se este parâmetro no modelo 2D com o modelo em co-cultura 3D com as três linhagens, observa-se aumento de aproximadamente cinco vezes, ou seja, a  $CC_{50}$  chegou em  $50 \pm 10 \mu\text{M}$ .

Da mesma forma, a dacarbazina apresentou um aumento de três vezes na  $CC_{50}$  da monocultura 3D de B16F10 ( $2800 \pm 1000 \mu\text{M}$ ) quando comparada com a da monocultura 2D ( $870 \pm 70 \mu\text{M}$ ). O mesmo parâmetro em cultura 2D quando comparado com a co-cultura 3D ( $1500 \pm 500 \mu\text{M}$ ) demonstrou um aumento de aproximadamente duas vezes. Evidencia-se desta forma que o modelo 3D é importante na avaliação da citotoxicidade de novos compostos, pois demonstra a interferência do microambiente tumoral na eficácia da ação antitumoral.

Além disso, o diâmetro dos esferoides diminuiu com o aumento das concentrações de dacarbazina e do sal de isotiourônio MF03, sendo que a dacarbazina apresentou uma diminuição mais expressiva comparada com o composto MF03, não mostrando alguma relação com a  $CC_{50}$  destes compostos (Figuras 27 e 28). Somente concentrações de MF03 acima de  $100 \mu\text{M}$  conseguiram diminuir o diâmetro do monoesferoide de B16F10 e acima de  $1000 \mu\text{M}$  para o heteroesferoide de B16F10:J774:NIH/3T3. Em relação a este aspecto, um estudo relatou a redução do volume e a ruptura do esferoide tumoral pancreático com o aumento da concentração de gencitabina (WEN et al., 2013). O mesmo aconteceu em outro estudo, o qual relacionou a diminuição do volume esferoidal com a menor  $CC_{50}$  encontrada (IVANOV et al., 2014). No presente estudo, não se confirma esta relação direta entre menor  $CC_{50}$  e

o menor tamanho do esferoide e análises adicionais deverão ser realizadas para o entendimento deste fato.

Como já mencionado estas relações entre concentração para citotoxicidade e desestruturação dos esferoides devem estar diretamente relacionadas com o mecanismo de ação e propriedades físico-químicas de cada molécula. Das análises já realizadas para o MF03, sabe-se que o composto atua diminuindo a capacidade de migração de linhagens celulares de melanoma humano e apresentou seletividade para células tumorais (CISILOTTO et al., 2015).

Quanto à dacarbazina, o mecanismo de ação do fármaco está relacionado com a alquilação do DNA, o que impede a célula de proliferar (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009). Ou seja, uma ação não diretamente relacionada com a perturbação das propriedades de migração celular. Neste sentido, pode-se começar a entender as diferenças em citotoxicidade e os outros parâmetros avaliados neste trabalho, comparando-se com o MF03.

Ainda que alguns aspectos devam ser estudados para a produção de evidências mais conclusivas sobre as inter-relações que ocorrem entre os componentes do nosso modelo, o presente trabalho apresentou evidências de que o modelo multicelular tumoral 3D foi eficaz em formar esferoides em condições específicas com as linhagens celulares escolhidas. O sal de isotiourônio MF03 também demonstrou evidências positivas quanto à citotoxicidade celular não só na célula tumoral, mas também no estroma tumoral podendo ser um potencial agente para o tratamento de melanoma maligno.



## 7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, de acordo com os resultados obtidos, foi possível desenvolver um modelo tumoral *in vitro* de cultura celular tridimensional empregando três linhagens celulares: melanoma, macrófagos e fibroblastos murinos na proporção 1:1:1 em mono e co-cultura. Para a execução deste modelo foi selecionado, diante de uma imensa variedade o modelo de esferoide tumoral multicelular utilizando gel de agarose na concentração a 2 % e densidade celular total de  $1,2 \times 10^4$  células/poço. Os esferoides celulares obtidos apresentaram diâmetros médios a grande de 180 – 400  $\mu\text{m}$ . Em decorrência do grande tamanho dos esferoides, houve diminuição do número total de células presentes no esferoide no sétimo dia em relação ao quarto dia de cultivo 3D, provavelmente devido à privação de oxigênio e nutrientes, porém a viabilidade celular no interior dos esferoides foi de 75% no sétimo dia de cultivo. As imagens morfológicas obtidas confirmam os espaços vazios com ausência de células no interior dos esferoides. As análises morfológica do modelo também revelaram que apenas o monoesferoide de fibroblasto (NIH/3T3) e o heteroesferoide de melanoma, macrófagos e fibroblastos (B16F10:J774:NIH/3T3) formaram esferoides compactos e sem a presença de irregularidades na superfície. Por fim, o perfil inflamatório foi definido com os macrófagos polarizados um dia antes da execução do cultivo tridimensional, neste caso a linhagem macrofágica exibiu perfil clássico de macrófagos M1 e M2 quando estimulados com lipopolissacarídeo e dexametasona, respectivamente.

O tratamento dos esferoides revelou que o composto MF03, embora não tenha causado alterações no diâmetro dos esferoides, demonstrou-se mais citotóxico no monoesferoide tumoral e no heteroesferoide em comparação com a dacarbazina, fármaco já utilizado para o tratamento de melanoma. O sal de isotiourônio MF03 também demonstrou alta seletividade para a linhagem tumoral em monocultura em relação à linhagem não tumoral fibroblástica. Além disso, quando compara-se com resultados obtidos em modelos bidimensionais (2D), as células no modelo 3D demonstraram-se menos sensíveis aos compostos, tanto com o MF03 quanto com a dacarbazina, evidenciando possíveis interações estruturais e estromais para a proteção contra agentes antitumorais.

Como perspectivas deste trabalho, ficam a identificação das linhagens celulares no modelo tridimensional para finalização da caracterização, bem como a identificação da linhagem celular mais afetada com o tratamento do sal de isotiourônio MF03 e as alterações

que este sal pode causar na estrutura do esferoide e no perfil inflamatório dos macrófagos polarizados. Por fim, uma melhor comparação do modelo 3D com o modelo 2D com o intuito de avaliar as diferenças geradas no modelo 3D pela característica de sua estrutura esferoidal e pela resposta do microambiente tumoral frente a triagem de compostos com potenciais atividades antitumorais.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. Biology 's new dimension. **Nature. News Feature**, v. 424, p. 870–872, 2003.

ALLAN, R.D. et al. Structural analogs of ZAPA as GABAA agonists. **Neurochemistry International**, v. 30, p. 583-591, 1997.

AMANN, A. et al. Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

ASSUNÇÃO, L. Avaliação da citotoxicidade de sais de isotiourônio e tiazindionas para estudo de leucemia *in vitro*. **Dissertação (Mestrado em Farmácia)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2013.

ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 82–106, 2012.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.

BANDARCHI, B. et al. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, p. 644–648, 2013.

BATES, R. C.; EDWARDS, N. S.; YATES, J. D. Spheroids and cell survival. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 36, p. 61–74, 2000.

BERGAMIN, S. et al. Differential Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-5'9'-Nucleotidase. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2012.

BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of Metastatic Melanoma : An Overview. **Oncology**, v. 23, n. 6, p. 488–496, 2009.

- BÖGELS, M. et al. Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function*. n. April 2016, 2012.
- BOYCE, S. T. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. **Burns**, v. 27, p. 523–533, 2001.
- BRESLIN, S.; DRISCOLL, L. O. Three-dimensional cell culture : the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, 2013.
- BUCKLEY, C. D. Why does chronic inflammatory joint disease persist ? **Clinical Medicine**, v. 3, n. 4, p. 361–366, 2003.
- CALORINI, L. et al. Enhancement of nitric oxide release in mouse inflammatory macrophages co-cultivated with tumor cells of a different origin. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 22, p. 413–419, 2005.
- CARLSSON, J.; YUHAS, J. M. Liquid-Overlay Culture of Cellular Spheroids. **Recent Results in Cancer Research**, v. 95, n. Foa 4, p. 1–23, 1984.
- CHEN, P. et al. Tumor-Associated Macrophages Promote Angiogenesis and Melanoma Growth via Adrenomedullin in a Paracrine and Autocrine Manner. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 23, p. 7230–7239, 2011.
- CHIN, L.; GARRAWAY, L. A.; FISHER, D. E. Malignant melanoma: Genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes and Development**, v. 20, n. 16, p. 2149–2182, 2006.
- CHOI, I.-K. et al. Strategies to Increase Drug Penetration in Solid Tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. 193, p. 1–18, 2013.
- CISILOTTO, J. et al. Isothiouonium salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1-10, 2015.
- COMITO, G. et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression.

**Oncogene**, v. 2013, n. April, p. 1–9, 2013.

CORNIL, I. et al. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. **Cell Biology**, v. 88, p. 6028–6032, 1991.

EREZ, N. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. **Cancer Cell**, v. 17, n. 2, p. 135–147, 2010.

ESPANOL, A. J. et al. Treatment with LPS plus INF- $\gamma$  induces the expression and function of muscarinic acetylcholine receptors, modulating NIH3T3 cell proliferation: participation of NOS and COX Table of Links. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 5154–5167, 2014.

FERREIRA, M.; SÁ, M. M. Formal [3+2] Annulation Involving Allylic Bromides and Thioureas. Synthesis of 2-Iminothiazolidines through a Base-Catalyzed Intramolecular anti-Michael Addition. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 357, n. 4, p. 829–833, 2015.

FLEISCHMAJER, R. et al. Initiation of skin basement membrane formation at the epidermo-dermal interface involves assembly of laminins through binding to cell membrane receptors. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 1929–1940, 1998.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

GANELLIN, C.R. et al. Imetit and N-methyl derivatives. The transition from potent agonist to antagonist at histamine H<sub>3</sub> receptors.1. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 1231-1234, 1992.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 2010.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, p. 1–13, 2014.

GORDON, R. SKIN CANCER:AN OVERVIEW OF EPIDEMIOLOGY AND RISK FACTORS. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160–169, 2013.

GOUNDIAM, O.; NAGEL, M.; VAYSSADE, M. Growth and survival signalling in B16F10 melanoma cells in 3D culture. **Cell biology international**, v. 34, p. 385–391, 2010.

GRATCHEV, A. et al. Alternatively Activated Antigen-Presenting Cells : Molecular Repertoire , Immune Regulation , and Healing. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, p. 272–279, 2001.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature Insight Review**, v. 445, p. 851-, 2007.

GRIESS, Peter. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen”. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426-428, 1879.

HAMILTON, G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. **Cancer Letters**, v. 131, p. 29–34, 1998.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.

HENDRICKS, R.T. et al. 2-aryldolyl maleimides - novel and potent inhibitors of protein kinase C. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p. 67-72, 1995.

HIRSCHHAEUSER, F. et al. Multicellular tumor spheroids : An underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3–15, 2010.

HSUCHEN, C.; FEINGOLD, D. S. Selective Membrane Toxicity of the Polyene Antibiotics : Studies on Lecithin Membrane Models ( Liposomes ). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, n. 3, p. 309–315, 1973.

HUSSEIN, M. R. Tumour-associated macrophages and melanoma

tumourigenesis: integrating the complexity. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 3, p. 163–176, 2006.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2> >. Acesso em 02 de janeiro de 2017a.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: < [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pel\\_e\\_nao\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pel_e_nao_melanoma) >. Acesso em 02 de janeiro de 2017b.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: < [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pel\\_e\\_melanoma/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pel_e_melanoma/definicao) >. Acesso em 02 de janeiro de 2017c.

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

JAGANATHAN, H. et al. Three-Dimensional In Vitro Co-Culture Model of Breast Tumor using Magnetic Levitation. **Scientific Reports**, v. 4, n. 6468, p. 1–9, 2014.

JEONG, S. et al. Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–17, 2016.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, 2006.

KIM, J. BIN. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Seminars in cancer biology**, v. 15, n. 5, p. 365–377, 2005.

KUNZ-SCHUGHART, L. et al. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening : The Multicellular Spheroid Model. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 9, n. 4, p. 273–285, 2004.

LEE, G. Y. et al. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 359–

365, 2007.

LEE, H.-W. et al. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1835, n. 2, p. 170–179, 2013.

LEONARD, F.; COLLNOT, E.; LEHR, C. A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 2103–2119, 2010.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 605–613, 2006.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 375–379, 2001.

MAKITIE, T. et al. Tumor-Infiltrating Macrophages (CD68+ Cells) and Prognosis in Malignant Uveal Melanoma. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, n. 7, p. 1414–1421, 2001.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization : tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages : An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451–483, 2009.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 571–582, 2009.

MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 192–204, 2012.

MIKI, Y. et al. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, n. 3–5, p. 68–75, 2012.



MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of Murine Macrophages. **Current Protocols in Immunology**, p. 1–9, 2008.

MOVAHEDI, K. et al. Different Tumor Microenvironments Contain Functionally Distinct Subsets of Macrophages Derived from Ly6C ( high ) Monocytes. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5728–5739, 2010.

**NATIONAL CANCER INSTITUTE** – Layers of the Skin (Don Bliss). Disponível em: < <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=4366> >. Acesso em: 08 de janeiro de 2017.

NEDERMAN, T. et al. Demonstration of an Extracellular Matrix in Multicellular Tumor Spheroids. **Cancer Research**, v. 44, p. 3090–3097, 1984.

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Modeling dynamic reciprocity: Engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 342–352, 2010.

RAMA-ESENDAGLI, D. et al. Spheroid formation and invasion capacity are differentially influenced by co-cultures of fibroblast and macrophage cells in breast cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 5, p. 2885–2892, 2014.

RAVI, M. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, 2015.

RAVI, M.; SHRUTI, B.; MADHUMITHA, H. Discovery tools for solid tumor research. **Journal of Solid Tumors**, v. 2, n. 1, p. 34–42, 2012.

REGAN, B.M.; GALYSH, F.T.; MORRIS, R.N. 2-thiopseudourea moiety a new local anesthesiophore. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 649, 1967.

RIGEL, D. S.; CARUCCI, J. A. Malignant Melanoma : Prevention , Early Detection , and Treatment in the 21st Century. **CA - A Cancer Journal for Clinicians**, v. 50, n. 4, p. 215–236, 2000.

ROSS, D. D. et al. Estimation of Cell Survival by Flow Cytometric Quantification of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide Viable Cell Number. **Cancer Research**, v. 49, p. 3776–3782, 1989.

SANDRU, A. et al. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, n. 4, p. 572–576, 2014.

SANTIAGO-GARCI, J.; KODAMA, T.; PITAS, R. E. The Class A Scavenger Receptor Binds to Proteoglycans and Mediates Adhesion of Macrophages to the Extracellular Matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 6942–6946, 2003.

SANTINI, M. T.; RAINALDI, G. Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. **Pathobiology**, v. 67, p. 148–157, 1999.

SATO, R. et al. Three-Dimensional Spheroidal Culture Visualization of Membranogenesis of Bruch ' s Membrane and Basolateral Functions of the Retinal Pigment Epithelium. **Retinal Cell Biology**, v. 54, n. 3, p. 1740–1749, 2016.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives : A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015.

SIMPSON, C. L.; PATEL, D. M.; GREEN, K. J. Deconstructing the skin : cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 565–580, 2011.

**SKIN CANCER FOUNDATION**. Disponível em: < <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/melanoma-warning-signs-and-images/do-you-know-your-abcde#panel1-1> >. Acesso em 20 de dezembro de 2016.

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages ( TAM ) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, p. 1065–1073, 2009.

STEPHAN, S.; JOHNSON, W. E.; ROBERTS, S. The influence of nutrient supply and cell density on the growth and survival of intervertebral disc cells in 3d culture. **European Cells and Materials**, v. 22, p. 97–108, 2011.

SULLIVAN, R. J.; LORUSSO, P. M.; FLAHERTY, K. T. The Intersection of Immune-Directed and Molecularly Targeted Therapy in Advanced Melanoma : Where We Have Been, Are and Will Be. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 12, p. 5283–5291, 2013.

SUTHERLAND, R. M. Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions : The Multicell Spheroid Model. **Science**, v. 240, n. 4849, p. 177–184, 1988.

TALUKDAR, S. et al. Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2149–2159, 2011.

TRANI, A. et al. Thioureas and sothiouronium salts of the aglycone of teicoplanin. 1. Synthesis and biological-activity. **Journal of Antibiotics**, v. 42, p. 1268-1275, 1989.

TRAVÉS, P. G.; LUQUE, A.; HORTELANO, S. Macrophages, Inflammation, and Tumor Suppressors: ARF, a New Player in the Game. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

TREDAN, O. et al. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441–1454, 2007.

VÉRTESI, C.; MOLNÁR, A.; GUCZOGHY, L. Isothiouronium Salts. **Chemical Abstracts**, p. 105, 1985.

VOGEL, D. Y. S. et al. Immunobiology Human macrophage polarization in vitro : Maturation and activation methods compared. **Immunobiology**, v. 219, n. 9, p. 695–703, 2014.

WEISWALD, L.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor. **NEO**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.

WEN, Z. et al. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing , using the acid phosphatase assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 634–642, 2013.

WENG, A. et al. The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 3, p. 323–332, 2012.

WHO - **World Health Organization**. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em:< >. Acesso em: 15 dezembro de 2016.

WHO – **World Health Organization**. Disponível em: < <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> >. Acesso em 02 de janeiro de 2017.

WHO – **World Health Organization**. Disponível em: < [http://www.who.int/uv/health/uv\\_health2/en/index1.html](http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html) >. Acesso em 02 de janeiro de 2017a.

WU, S. et al. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 218–225, 2012.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. **Cell**, v. 130, p. 601–610, 2007.

YANG, T.; SINAI, P.; KAIN, S. R. An Acid Phosphatase Assay for Quantifying the Growth of Adherent and Nonadherent Cells. **Analytical Biochemistry**, v. 241, n. 383, p. 103–108, 1996.

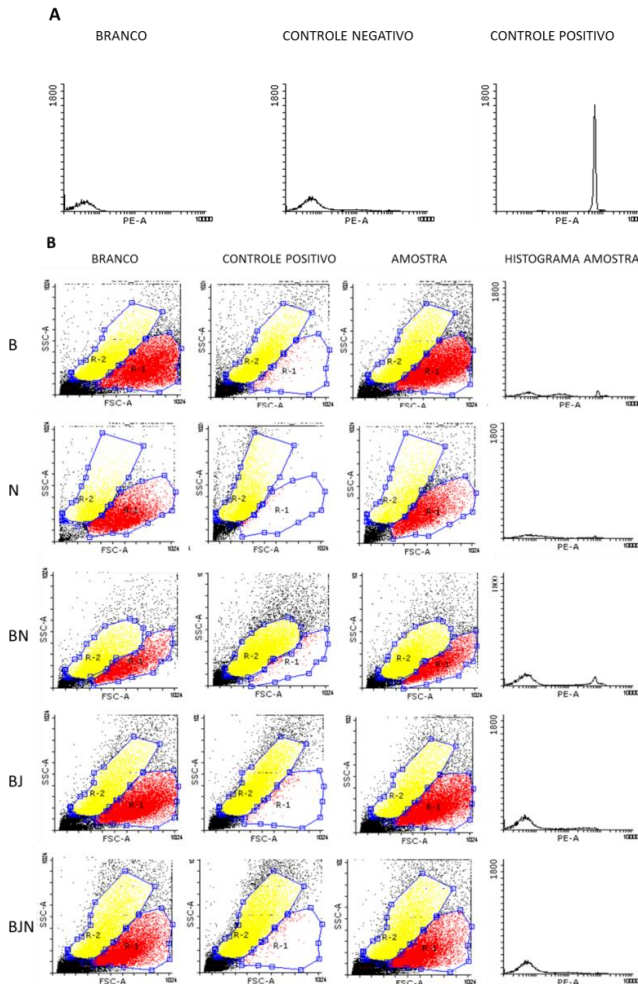
YUHAS, J. M. et al. A Simplified Method for Production and Growth of Multicellular Tumor Spheroids. **Cancer Research**, v. 37, p. 3639–3643, 1977.

ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening : a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 19103, p. 1–11, 2016.

ZIETARSKA, M. et al. Molecular Description of a 3D In Vitro Model for the Study of Epithelial Ovarian Cancer ( EOC ). **Molecular Carcinogenesis**, v. 46, p. 872–885, 2007.

## APÊNDICE A – Viabilidade celular

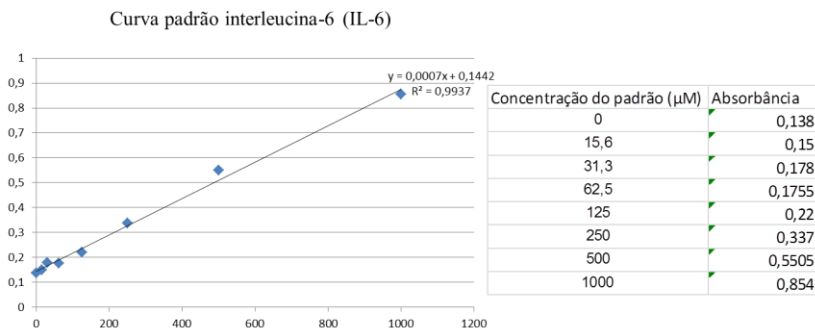
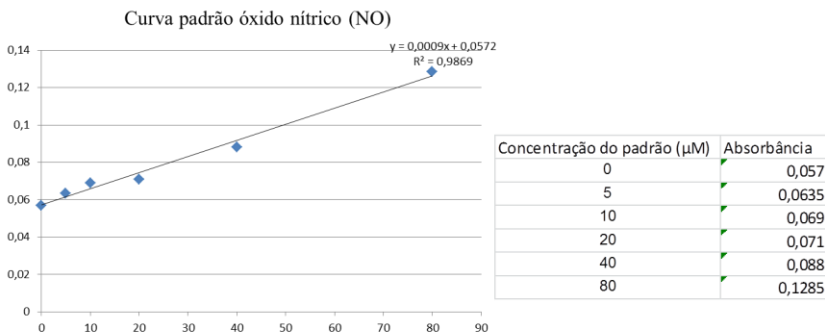
Figura 29 – Viabilidade celular por citometria de fluxo: Iodeto de propídeo (IP)



Viabilidade celular por citometria de fluxo com marcação de PI. A) Perfil padrão do histograma de PI para branco (sem marcação), controle positivo e controle negativo. B) *Dot plots* e histograma dos brancos, controles positivos e amostras de cada condição. Foram observadas duas populações distintas: R1 e R2, em todos os esferoides B = B16F10; N = NIH/3T3; BJ = B16F10:J774; BN = B16F10:NIH/3T3; BJN = B16F10:NIH/3T3:J774.

## APÊNDICE B – Curvas analíticas 'NO e IL-6

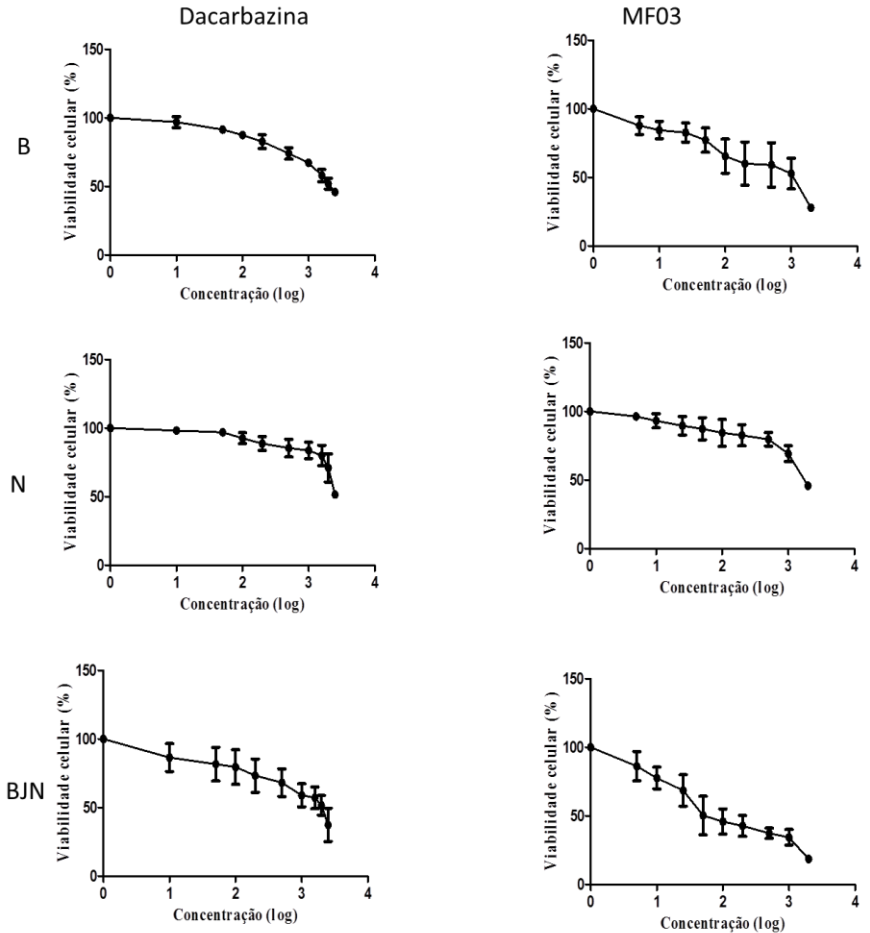
Figura 30 – Curvas analíticas 'NO e IL-6



A absorbância dos padrões foi analisada em duplicata. O resultado expresso refere-se a média de duas determinações.

## APÊNDICE C – Curvas de concentração – resposta dacarbazina e MF03

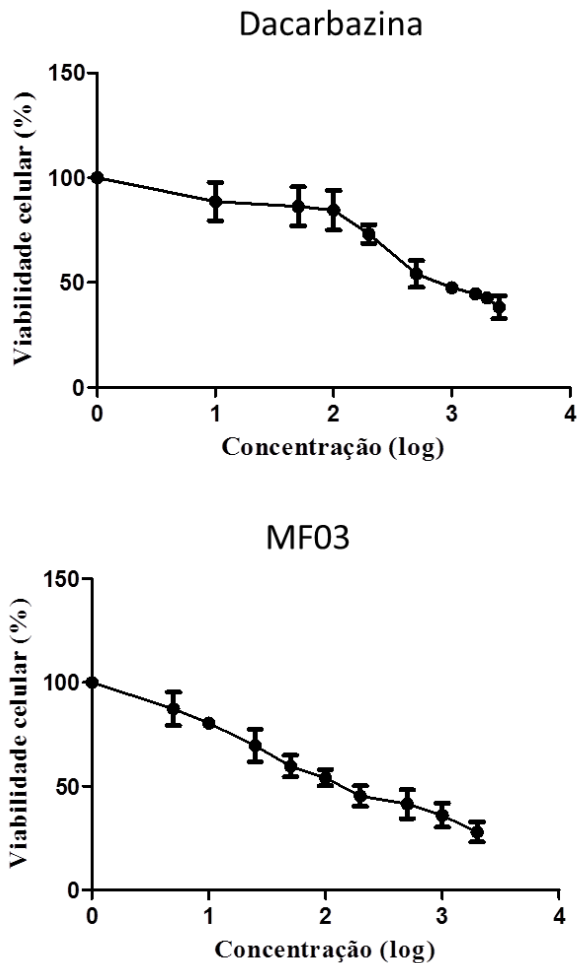
Figura 31 – Curvas de concentração – resposta das condições 3D com dacarbazina e MF03



A viabilidade celular diminui a medida que a concentração de dacarbazina e MF03 aumenta. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. n=3. B = B16F10; N = NIH/3T3; BJJ = B16F10:NIH/3T3:J774.

### APÊNDICE D – Curvas de concentração – resposta dacarbazina e MF03 em cultura 2D

Figura 32 – Curvas de concentração – resposta da condição 2D de monocultura com B16F10 com dacarbazina e MF03



A viabilidade celular diminui à medida que a concentração de dacarbazina e MF03 aumenta. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.  $n=3$ .