

Marjorie Guida Pereira Marin

**MODELO DE MELANOESFERA PARA PESQUISA 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.a Dr.a Tânia Beatriz Creczynski Pasa

**Florianópolis
2018**

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

Marin, Marjorie Guida Pereira
MODELO DE MELANOSFERA PARA PESQUISA DE NOVOS
AGENTES ANTITUMORAIS / Marjorie Guida Pereira Marin
; orientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, 2018.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Melanosferas. 3.
Heterogeneidade tumoral. 4. Células tronco
tumerais. 5. Sal de isotiurônio. I. Pasa, Tânia
Beatriz Creczynski. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

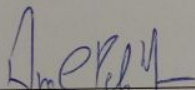
**“Modelo de melanoesfera para pesquisa de novos
agentes antitumorais”**

POR

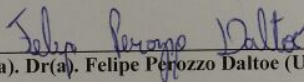
Marjorie Guida Pereira Marin

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

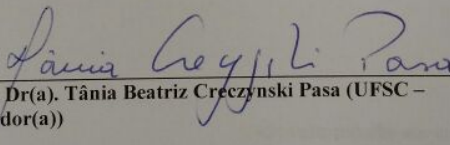
Banca Examinadora:



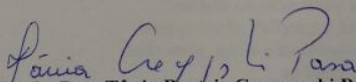
Prof(a). Dr(a). Ana Carolina Rabello de Moraes (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Felipe Perazzo Daltoe (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, 09 de março de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais
Maurício (*in memoriam*) e Silvana, e às
minhas irmãs, Pollyana e Ana Beatriz por
todo amor, apoio e incentivo demonstrados
ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por me receber no laboratório e me incentivar constantemente com toda sua determinação e vontade de compartilhar os conhecimentos adquiridos;

Aos amigos do laboratório GEIMM, por todas os dias de companheirismo, incentivo e principalmente, por todos os momentos divertidos. A vocês: Adny, Julia, Leônidas, Gabriela, Daiane, Najla, Rafael, Carol, Anne, Leticia, Fernanda e Tamara, muito obrigada!

À Michele, agradeço por ter me guiado durante essa jornada e por ter sido muito mais que uma companheira de laboratório. Com toda certeza este trabalho não teria sido o mesmo sem você;

À Laura, por toda a parceria que vai além do laboratório. Você foi fundamental durante todo o processo. Obrigada por não desistir de mim;

À professora Iara Fabrícia Kretzer, muito obrigada por ter me ensinado tanto.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Farmácia por terem possibilitado o desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Marcus Mandolesi Sá e seu aluno Misael Ferreira, pelo desenvolvimento e fornecimento do composto químico utilizado neste estudo;

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

Ao CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro;

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com esta dissertação;

Aos meus grandes amigos, Thais, Juliana, Maya, Eli e Leo por todo o apoio e pela leveza que a presença e o amor de vocês me proporcionam;

Incluo, de forma especial, meus amigos Bruno, Gustavo, Lucas e Thales, por terem surgido em um momento único e por me mostrarem, todos os dias, que a amizade e o carinho vencem todas as distâncias;

À minha família, por todo apoio e incentivo. Vocês são a parte mais importante de mim. Aos meus pais, Silvana e Maurício, e minhas irmãs, Pollyana e Ana Beatriz, obrigada, este trabalho é de vocês!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota”.

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer altamente agressivo, com altas taxas de metástases e, em estágios avançados, é resistente aos tratamentos convencionais. A resistência ao tratamento e a recorrência da doença tem sido relacionadas à sobrevivência de um subconjunto de células denominadas células tronco tumorais (CTT). Esta população de células tem capacidade de auto-renovação e podem gerar descendentes heterogêneos mantendo algumas semelhanças com as células tumorais iniciais. Neste sentido, neste estudo desenvolveu-se um modelo de melanoesfera capaz de aumentar a expressão de marcadores associados às CTT, sem a utilização de meios de diferenciação a fim de avaliar a potencial atividade do sal de isotiourônio MF08 (SI-MF08) - composto já estudado pelo nosso grupo de pesquisa - frente a esta população de células. As melanoesferas foram obtidas a partir de baixa densidade celular (< 1 célula/ μ L) em condições não aderentes, através do uso de gel de agarose 2 % em diferentes volumes (30, 40 e 50 μ l/poço) para estabelecer a melhor condição de formação. O volume de 30 μ L de agarose 2% parece ser a condição ideal para o modelo esferoide, uma vez que as melanoesferas formadas apresentaram um número significativamente maior de células viáveis (6800 ± 1000 células/esferoide) quando comparadas aos demais volumes (2890 ± 730 , 2047 ± 680 para 40 e 50 μ L de agarose 2 %, respectivamente). A presença dos marcadores de superfície CD133 e CD44 foi escolhida para investigar se a formação de melanoesferas foi capaz de enriquecer a população de células com características associadas a CTT. Análises por microscopia confocal e citometria de fluxo foram então realizadas para identificar células CD133 e CD44 positivas em cultura monocamada (2D) de B16F10, bem como em melanoesferas. A porcentagem de células CD133 positivas em cultura 2D foi de 20 % e aumentou para 76% nas melanoesferas. Para CD44, o aumento foi ainda maior, com uma porcentagem de células positivas em cultura 2D de 7 % e 83 % em melanoesferas. Além disso, as melanoesferas foram expostas a três concentrações diferentes de SI-MF08 (9, 17,5 e 35 μ M) e no final do 7º dia de cultura, a exposição ao composto foi capaz de inibir significativamente o crescimento da melanoesferas em 15, 59 e

70 %, respectivamente. Diante dos resultados, foi demonstrado que é possível a formação de melanosferas com alta porcentagem de células CD133 e CD44 positivas sem o uso de meio de diferenciação. Além disso, o modelo proposto torna-se uma ferramenta importante no estudo *in vitro* do potencial citotóxico de novos agentes antitumorais.

Palavras-chave: Melanosferas, heterogeneidade tumoral, células tronco tumorais, sal de isotiourônio MF08.

ABSTRACT

Melanoma is a highly aggressive type of cancer due to the possibility of generating metastases and, in advanced stages it is resistant to conventional treatments. Resistance to treatment and disease recurrence has been linked to the survival of a subset of cells called cancer stem cells (CSC). This cell population has self-renewal capacity and can generate heterogeneous offspring that retain some similarities with the initial tumor. Thus, in this study, a melanosphere model was developed to increase the expression of markers associated with CSC, without the use of differentiation medium, in order to evaluate the potential activity of the isothiuronium salt MF08 (IS-MF08) – a compound already studied by our research group - against this cell subset. The melanospheres were obtained through low cell density (<1 cell / μ l) under nonadherent conditions, using different volumes of agarose gel 2% (30, 40 and 50 μ l / well) to establish the best formation condition. The volume of 30 μ L of agarose appeared to be the ideal condition for the spheroid model since the melanospheres formed presented a significantly higher number of viable cells (6800 ± 1000) when compared to the other volumes (2890 ± 730 , 2047 ± 680 for 40 and 50 μ L of agarose 2%, respectively). Confocal analyzes and flow cytometry were performed to identify positive CD133 and CD44 cells in monolayer culture (2D) of B16F10 as well as in melanospheres. The percentage of positive CD133 cells in a 2D culture was 20% and increased up to 76% in melanospheres. For CD44 the increase was even higher with a percentage of positive cells consisting in 7% going up to 83% in melanospheres. After confirmation that melanospheres hold a high percentage of both, CD133 and CD44 they were exposed to three different concentrations of IS-MF08 (9 μ M, 17.5 μ M and 35 μ M). At the end of the 7th day of culture, the exposure to the compound was able to significantly prevent melanosphere growth in 15%, 59% and 70%, respectively. Considering the results, it is possible the formation of melanospheres with high percentage of CD133 and CD44 positive cells without the presence of specific medium. In addition, the melanosphere model is an important tool in the *in vitro* study of the cytotoxic potential of new anticancer agents.

Key words: Melanospheres, tumor heterogeneity, cancer stem cells, isothiuronium salt MF08.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características das lesões de melanoma maligno	26
Figura 2. Modelo de heterogeneidade intra-tumoral.....	29
Figura 3. Hipóteses para o aparecimento de células tronco tumorais.....	32
Figura 4. Modelo de tumoresfera.....	34
Figura 5. Estrutura do sal de isotiurônio MF08.....	43
Figura 6. Melanoesferas obtidas em função do volume de gel de agarose 2% e do tempo de cultivo.....	48
Figura 7. Área das melanoesferas no quarto e sétimo dia de cultivo.....	49
Figura 8. Viabilidade celular das melanoesferas.....	50
Figura 9. Morfologia superficial das melanoesferas.....	51
Figura 10. Visualização da presença e marcadores de superfície associados com CTT em B16F10.....	53
Figura 11. Visualização da presença de marcadores de superfície associados a CTT em melanoesferas.....	54
Figura 12. Quantificação de células CD133 e CD44 positivas.....	55
Figura 13. Melanoesferas obtidas após exposição ao SI-MF08	56
Figura 14. Efeito do SI-MF08 em melanoesferas no quarto e sétimo dia de cultivo.....	57
Figura 15. Viabilidade e efeito do SI-MF08 em melanoesferas no sétimo dia de cultivo.....	58

Figura 16. Quantificação de células CD133 e CD44 positivas após exposição a SI-MF08.	59
Figura 17. Linha do tempo do estabelecimento da cultura primária.	60
Figura 18. Crescimento das melanosferas obtidas a partir de cultura primária.	62
Figura 19. Análise morfológica das melanosferas realizada por microscopia eletrônica de varredura.....	63
Figura 20. Visualização da presença de marcadores de superfície associados a CTT em melanosferas formadas a partir de cultura primária.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área das melanoesferas em função do volume de gel de agarose 2% e do tempo de cultivo	47
Tabela 2. Número de células totais em função do volume de gel de agarose 2%.....	50
Tabela 3 Número de células totais após exposição a diferentes concentrações de SI-MF08	58
Tabela 4. Quantificação do número de células por melanoesfera	62

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ANOVA	Análise de variância
B16F10	Linhagem celular murina de melanoma
CC ₅₀	Concentração citotóxica do composto que causa 50% de morte celular
CTT	Célula tronco tumoral
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagles's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
HEPES	ácido N- [2-Hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HMDS	Hexametildisilazano
INCA	Instituto Nacional de Câncer José de Alencar
MF08	brometo de (Z)-2- (isotioureidometil)-2-pentenoato de metila
TME	Transição mesenquimal-epitelial
PBS	Tampão fostato salino
SFB	Soro fetal bovino

SI

Sal de isotiurônio

WHO

World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	MELANOMA	25
2.2	HETEROGENEIDADE TUMORAL	27
2.3	CÉLULAS TRONCO TUMORAIS	30
2.4	MODELO ESFEROIDE	33
2.5	SAIS DE ISOTIURÔNIO	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	METODOLOGIA	39
4.1	Reagentes	39
4.2	Cultura Celular	39
4.3	Padronização do modelo de melanosferas	40
4.3.1	Formação das melanosferas	40
4.3.2	Viabilidade celular	40
4.3.3	Tamanho da melanosfera	41
4.3.4	Morfologia da melanosfera	41
4.4	Avaliação de marcadores de superfície	41
4.4.1	Microscopia Confocal	41
4.4.2	Citometria de Fluxo	42
4.5	Tratamento com SI-MF08	43
4.5.1	Composto	43
4.5.2	Tratamento das melanosferas	43
4.5.3	Viabilidade celular	44
4.5.4	Tamanho da melanosfera	44
4.5.5	Avaliação de marcadores de superfície	44
4.6	Cultura primária de células tumorais retiradas de tumor induzido por células B16F10	44
4.6.1	Aspectos éticos	44
4.6.2	Animais	44
4.6.3	Modelo de indução de tumor	45
4.6.4	Cultura celular primária a partir de tecido tumoral congelado	45
4.6.5	Formação do esferoide	45
4.6.6	Viabilidade celular	46
4.6.7	Tamanho das melanosferas	46

4.7	Análise estatística	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Padronização do modelo de melanoesferas	47
5.2	Avaliação de marcadores de superfície com associados com CTT.....	52
5.3	Investigação da atividade antitumoral do SI-MF08 em melanoesferas	55
5.4	Obtenção de melanoesferas a partir de cultura primária..	59
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO	73
8	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS.....	75
	APÊNDICE A - Parecer do comitê de ética no uso de animais.....	87
	APÊNDICE B - Perfil padrão dos <i>dot plots</i> e histograma utilizados.....	88

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no Brasil, representando 30% dos tumores malignos registrados. Neste grupo, o melanoma é considerado o mais severo e agressivo pela elevada taxa de metástases e também pelo alto índice de mortalidade. No Brasil, a estimativa para o ano de 2018 é de cerca de 6.000 novos casos (INCA, 2018).

O melanoma desenvolve-se nas células responsáveis pela produção de melanina (melanócitos) e, em função de metástases, pode ser encontrado em diversos tecidos e órgãos. Se detectado nos estágios iniciais, o prognóstico para esse tipo de câncer pode ser considerado bom. Porém, em estágios mais avançados, o melanoma é resistente aos tratamentos convencionais (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Os tratamentos utilizados para combater esta doença são capazes de induzir a regressão dos tumores em apenas 5-20 % dos pacientes (GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007). Neste sentido, a resistência ao tratamento e a recorrência da doença tem sido relacionadas com a sobrevivência de um subgrupo de células denominadas células tronco tumorais (CTT) (DONNENBERG; DONNENBERG, 2005). As CTT são altamente proliferativas, podem auto-renovar-se, iniciar tumores e diferenciar-se em populações heterogêneas (TURKSEN, 2013).

O modelo esferoide tem sido utilizado para o enriquecimento de CTT *in vitro*. Neste método, a partir de baixa densidade celular (20 células/ μ L), em condições flutuantes (não-aderentes) e com a utilização de meio de cultura suplementado com fatores de crescimento e desprovido de soro bovino fetal, somente as células com características *stem-like* são capazes de sobreviver e proliferar (FEDER-MENGUS et al., 2008). Neste contexto, marcadores celulares como o CD133 e o CD44 têm sido utilizados para a identificação de células tumorais com características *stem-like* (AHRENS et al., 2001; KUMAR et al., 2016; WELTE et al., 2013).

Como as CTT tem sido associadas à resistência e sobrevivência de tumores, bem como com a capacidade de criar metástases, a avaliação do efeito citotóxico de novos agentes antitumorais sobre esta subpopulação de células torna-se

necessária para um tratamento mais eficaz (FRANK; SCHATTON; FRANK, 2010).

Em trabalho anterior, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, o sal de isotiourônio MF08 (SI-MF08) apresentou atividade citotóxica *in vitro* em células de leucemia e *in vivo* em modelo murino de melanoma (indução com a linhagem B16F10), com notável inibição do crescimento tumoral e aumento da sobrevida dos animais (ASSUNÇÃO, 2017; CISILOTTO et al., 2015; FERREIRA et al., 2017).

Portanto, o objetivo deste estudo consiste em desenvolver um modelo de melanoesfera capaz de aumentar a expressão de marcadores associados a CTT, sem a utilização de meios de diferenciação a fim de avaliar a potencial atividade do SI-MF08 frente a esta população de células.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELANOMA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, câncer é um termo genérico usado para um grande grupo de doenças caracterizadas por apresentar rápido crescimento de células anormais e potencial capacidade de invadir partes adjacentes do corpo e espalhar-se para outros órgãos. Atualmente, é a segunda maior causa de mortalidade no mundo sendo responsável por aproximadamente 8,8 milhões de mortes em 2015 (WHO, 2017).

No Brasil, são esperados 600 mil novos casos de câncer para o ano de 2018. Entre eles, o câncer de pele é o mais frequente no país e corresponde a 30 % de todos os tumores malignos registrados (INCA, 2018).

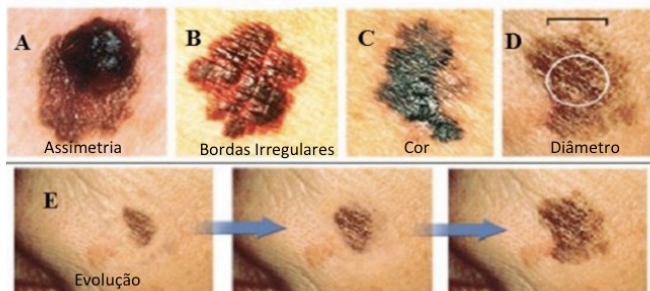
As neoplasias cutâneas podem ser classificadas em: câncer de pele não melanoma (incluem os subtipos carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas) e melanoma (GREINERT, 2009).

O melanoma compreende apenas 3 % dos tipos de câncer de pele, porém é considerado o mais grave devido a grande possibilidade de desenvolvimento de metástases, sendo responsável por aproximadamente 79 % das mortes por tumores cutâneos. Para o ano de 2018, são estimados cerca de 6.260 novos casos de melanoma (INCA, 2018).

O melanoma é uma neoplasia maligna dos melanócitos, células derivadas da crista neural, responsáveis pela produção do pigmento melanina e estão presentes em diversos tecidos e órgãos como a epiderme, epitélio da cavidade nasal, orofaringe, mucosa oral, olhos, entre outros. Esta neoplasia apresenta significativa variação clínica e histopatológica associadas ao local de aparecimento e idade (WHITEMAN; PAVAN; BASTIAN, 2011). A maioria dos casos ocorre na superfície da pele e características atípicas nas manchas da pele como coloração variada, bordas irregulares e assimetria da lesão podem ser indicativos de melanoma (TÍMÁR et al., 2013). O sistema ABCDE tem sido utilizado na clínica para identificação de lesões pigmentadas com possíveis sinais de malignidade. Neste sistema, A representa assimetria; B bordas irregulares; C

variação de cor; D diâmetro superior a 6 mm e E evolução da lesão (Fig. 1) (CHAIDEMENOS et al., 2008).

Figura 1. Características das lesões de melanoma maligno



Fonte: adaptado de *Skin Cancer Foundation* (2018)

Os fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo envolvem a interação de componentes tanto genéticos quanto ambientais. A radiação ultravioleta (UV) resultante da exposição ao sol representa um dos maiores fatores de risco, pois tem efeitos nocivos através de mecanismos diretos e indiretos, como mutações genéticas, imunossupressão e estresse oxidativo (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). Além disso, idade, sexo, histórico familiar e dieta também podem ser fatores de risco associados à doença (ARRANGOIZ et al., 2016; GORDON, 2013).

O melanoma pode ser classificado histopatologicamente pela alta diversidade morfológica em quatro subtipos: melanoma de dispersão superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno e melanoma lentiginoso acral. Embora o subtipo histológico não se correlacione diretamente com o comportamento clínico, a subclasse é importante para o diagnóstico e reconhecimento histopatológico (ARRANGOIZ et al., 2016; MORENO; CONTE; MENEGAT, 2015; WHITEMAN; PAVAN; BASTIAN, 2011).

A abordagem terapêutica primária para o melanoma é a excisão cirúrgica, que é aproximadamente 100 % eficaz no tratamento de um tumor precoce. Quimioterapia e terapia adjuvante, incluindo o uso de modificadores de resposta biológica e vacinas são alternativas em casos de tumores mais

avançados (MAVERAKIS et al., 2015; RIGEL; CARUCCI, 2000). Alguns dos tratamentos utilizados incluem a administração de interleucina-2 ou interferon-alfa e quimioterapia com dacarbazina ou temozolomida, fármacos capazes de induzir a regressão dos tumores em apenas 5-20 % dos pacientes (GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007; RIETSCHER et al., 2008).

O melanoma é uma doença extremamente agressiva com alto potencial metastático e resistência notoriamente alta aos agentes citotóxicos. Em estágios avançados, por exemplo, o tempo de sobrevida dos indivíduos é em média de 6-9 meses. A alta resistência aos agentes citotóxicos pode estar relacionada aos baixos níveis de apoptose espontânea *in vivo* em células de melanoma em comparação com outros tipos de células tumorais, somados a resistência à apoptose induzida por fármacos *in vitro* (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Adicionalmente, a resistência ao tratamento e a recorrência da doença podem também estar relacionadas com a sobrevivência de um subgrupo de células denominadas células tronco tumorais (SCHATTON; FRANK, 2008).

2.2 HETEROGENEIDADE TUMORAL

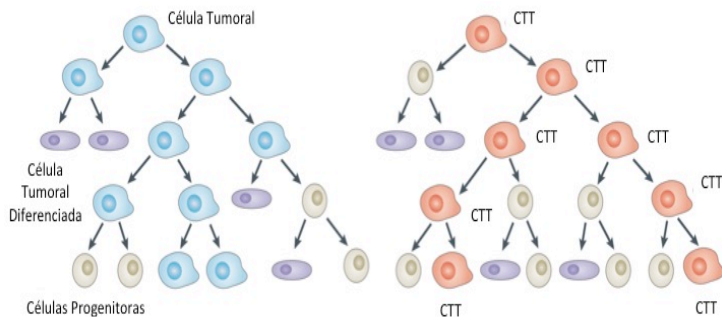
O tumor consiste em um ecossistema complexo contendo células tumorais e outros tipos celulares como células endoteliais, células infiltrantes do sistema imune e células estromais, bem como uma complexa rede de matriz extracelular que define diferenças espaço-temporais no microambiente tumoral. A heterogeneidade de ambos, tumor e microambiente, determina a aptidão do tumor e, como tais, devem ser considerados fatores cruciais para o sucesso do tratamento (MARUSYK; ALMENDRO; POLYAK, 2012; PRASETYANTI; MEDEMA, 2017).

Os diversos tipos de câncer frequentemente apresentam substancial heterogeneidade intra-tumoral em praticamente todas as características fenotípicas como morfologia celular, expressão gênica (incluindo a expressão de marcadores de superfície celular, fator de crescimento e receptores hormonais), metabolismo, motilidade, potencial proliferativo, angiogênico e

metastático (KRESO; DICK, 2014; MARUSYK; POLYAK, 2010).

Neste contexto, dois modelos foram propostos para explicar o crescimento do tumor e a heterogeneidade intratumoral (Figura 2). No primeiro modelo (estocástico) todas as células tumorais são equipotentes, mas são influenciadas por fatores intrínsecos (fatores de transcrição e vias de sinalização) e extrínsecos (resposta imune e microambiente). Estas influências são imprevisíveis ou aleatórias e resultam em heterogeneidade na expressão de marcadores de superfície celular, marcadores de maturação, início do ciclo celular e até na capacidade de iniciação do tumor. O princípio chave deste modelo é que todas as células do tumor são igualmente sensíveis a ações aleatórias e também podem reverter de um estado para outro porque as influências não induzem alterações permanentes. No segundo modelo, ao contrário, os tumores são organizados hierarquicamente como tecidos normais, ou seja, indica a existência de classes celulares biologicamente distintas e funcionalmente diferentes. Desse modo, apenas um subgrupo de células, chamadas de células tronco tumorais (CTT), contribuem para a manutenção do tumor em longo prazo. Além disso, ambos os modelos suportam a evolução clonal, na qual as células tumorais acumulam mutações genéticas que podem conferir vantagens que acarretam em maior sobrevivência do clone (BECK; BLANPAIN, 2013; DICK, 2008; VERMEULEN et al., 2012).

Figura 2. Modelo de heterogeneidade intra-tumoral.



Modelo estocástico (esquerda) e modelo hierarquizado (direita). CTT = Células Tronco Tumorais. Fonte: adaptado de BECK; BANPLAIN (2013)

A heterogeneidade intra-tumoral é encontrada na maioria dos tumores sólidos e foi documentada em uma variedade de tipos de câncer como câncer de cérebro, mama, pulmão, tireoide, bexiga, ovário e câncer gastrointestinal (ANDOR et al., 2016; AUBELE et al., 1999; COONS; JOHNSON; SHAPIRO, 1995; KLEIN et al., 2002; LE PENNEC et al., 2015).

Entre os tipos de tumores sólidos, o melanoma destaca-se por ser um dos mais agressivos, complexos e heterogêneos. A via de sinalização mais relevante para a transformação maligna do melanoma é a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), que está desregulada em cerca de 80 % dos melanomas. Cerca da metade dos melanomas têm uma mutação no gene B-RAF e 15 % a 30 % têm mutações no gene N-RAS (COLOMBINO et al., 2012).

Um estudo de revisão sistemática mostrou que a porcentagem de tumores heterogêneos, considerando o genótipo B-RAF foi de 8,9 % (79 de 973) e que esta taxa relativamente baixa deve-se ao fato de as mutações em B-RAF surgirem cedo no melanoma e, portanto, estão presentes na maioria das células tumorais (GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017; OMHOLT et al., 2003).

Outro estudo isolou três áreas distintas em 15 amostras de melanoma nodular e detectou mutações em B-RAF e N-RAS em 47 % e 33 % das amostras, respectivamente. Além disso, em

36 % dos pacientes foi encontrado discrepâncias no estado mutacional em pelo menos uma área do tumor quando comparado com todo o tumor, evidenciando a presença de diferentes populações clonais (CHIAPPETTA et al., 2015).

A heterogeneidade intra-tumoral em linhagens celulares e melanoma primário também foi observada em relação a expressão gênica de diversos marcadores e proteínas como A2B5, ABCB5, CD34, CD44, CD49B, CD49D, CD49f, CD54, CD133, CD166, HNK-1, Nestin e Oct $\frac{3}{4}$ (GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017).

Do ponto de vista clínico, as principais consequências da heterogeneidade observada em melanoma são os obstáculos no diagnóstico e tratamento. Em termos de diagnóstico, existe a necessidade de examinar múltiplas biópsias de cada tumor já que uma biópsia somente pode não representar todo o espectro mutacional do tumor. Já em termos de tratamento, a caracterização de todo o espectro de células tumorais, comumente exibindo características variáveis e distintas, é necessária uma vez que todas as células tumorais devem ser mortas para uma terapia bem-sucedida (GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017).

Deste modo, os estágios pré-clínicos do desenvolvimento terapêutico devem levar em consideração a heterogeneidade tumoral, já que conhecer a composição clonal de cada tumor torna-se uma ferramenta para otimizar as abordagens terapêuticas.

2.3 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

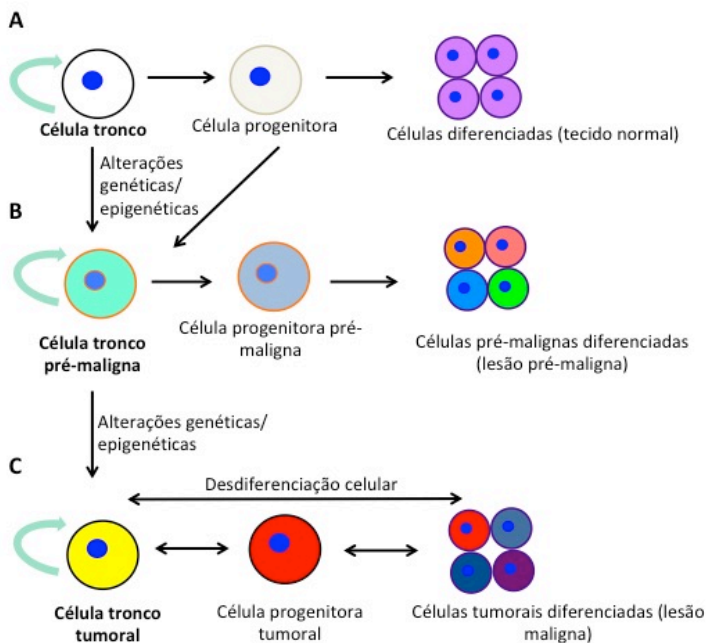
Por definição, células tronco tumorais são células que apresentam características “*stem-like*”, ou seja, têm alta capacidade proliferativa e de auto-renovação e ainda podem diferenciar-se em descendentes heterogêneos que mantêm certa similaridade com o tumor inicial (TURKSEN, 2013). As CTT foram primeiramente identificadas em 1994 quando pesquisadores observaram que uma população de células de leucemia mieloide aguda purificada, expressando marcadores de superfície celular específicos (CD34⁺CD38⁻), possuía capacidade de formar tumores quando injetadas em camundongos, enquanto outras populações de células

(CD34⁺CD38⁺ e CD34⁻), da mesma amostra, não possuíam essa capacidade (LAPIDOT et al., 1994; BONNET; DICK, 1997).

Entre as principais hipóteses que tentam explicar a aquisição de propriedades “*stem-like*” por células de um tumor, duas se destacam (Fig. 3): A primeira baseia-se na transformação maligna de células tronco adultas, ou seja, apenas as células tronco adultas, pela capacidade de auto-renovação e diferenciação, poderiam acumular ao longo do tempo as alterações genéticas e epigenéticas necessárias para conferir malignidade a uma célula. Além disso, as CTT compartilham diversas características com células tronco adultas como por exemplo, a habilidade de diferenciação e renovação, expressão de marcadores como o CD133 e também ativação de algumas vias de sinalização como a Notch (mecanismo de regulação que controla diversos processos de diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário e promove proliferação em diversos tipos de câncer, como o melanoma). Já a segunda hipótese diz que as propriedades “*stem-like*” podem ser adquiridas pelas células tumorais através de um processo de desdiferenciação celular, ou seja, no ambiente tumoral, as células diferenciadas podem adquirir habilidade de auto-renovação via transição epitélio-mesenquimal que confere certa plasticidade a célula tumoral e, além disso, facilita processos invasivos como a formação de metástases (AKBARI-BIRGANI et al., 2016; KUMAR et al., 2016; MAROTTA; POLYAK, 2009).

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) e o processo reverso, denominado transição mesenquimal-epitelial (TME), desempenham papéis centrais na embriogênese. Por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário precoce, a mesoderme gerada por TEMs desenvolve-se em vários tipos de tecido e, em seguida, as células mesodérmicas geram órgãos epiteliais, como o rim e o ovário, através de TMEs (THIERY; SLEEMAN, 2006). Sendo assim, a transição epitelial-mesenquimal tem sido intimamente associada à aquisição de traços agressivos por células de carcinoma por estar ligada ao favorecimento dos primeiros passos da metástase como invasão local e posterior disseminação de células tumorais para locais distantes (conferindo motilidade) além de invasividade e resistência à apoptose (MANI et al., 2008; SCHEEL; WEINBERG, 2012)

Figura 3. Hipóteses para o aparecimento de células tronco tumorais.



A) Tecido normal: as células tronco, capazes de autorrenovação e de manutenção tecidual, podem originar células progenitoras que irão se diferenciar de acordo com o tecido. B) Transformação maligna das células tronco ou progenitoras. C) Desdiferenciação celular. Fonte: adaptado de Islam et. al. (2015).

Como em um ambiente tumoral diversos subgrupos de células podem atuar de maneira diferente, tanto a transformação maligna de células tronco adultas quanto a desdiferenciação celular de células tumorais podem ocorrer simultaneamente. Além disso, devido à capacidade de iniciar tumores, as CTT desempenham funções importantes em processos como oncogênese, crescimento tumoral, metástase e recorrência. A recorrência do tumor, por exemplo, está relacionada à sobrevivência das CTT frente a terapias convencionais (MAROTTA; POLYAK, 2009).

A frequência exata de CTT em uma população celular ainda é indefinida, porém estudos em diferentes tipos de câncer

mostram uma vasta variedade que pode ser de 0,03 % - 100 %. Esta porcentagem, provavelmente, é determinada pelas características particulares da CTT como origem, linhagem e microambiente tumoral (BOIKO et al., 2010; MAROTTA; POLYAK, 2009; VISVADER; LINDEMAN, 2008). Porém, geralmente a frequência de CTT em uma população de células é baixa. No melanoma, por exemplo, esta subpopulação é heterogênea e apresenta distintas características moleculares que podem exibir propriedades “*stem-like*”. Entre os marcadores utilizados para identifica-la destacam-se o CD133 e o CD44 (KUMAR et al., 2016).

O CD133 consiste em um marcador proteico transmembrana presente em células tronco hematopoiéticas, células endoteliais progenitoras e células tronco neurais. A expressão deste marcador está relacionada com divisão celular assimétrica e, em CTT está relacionada com a capacidade de auto-renovação e principalmente de iniciar tumores (WELTE et al., 2013). O CD 44 consiste em um receptor transmembrana que interage com o ácido hialurônico (componente da matriz extracelular) e em melanoma é associado à progressão do tumor e a formação de metástases (AHRENS et al., 2001).

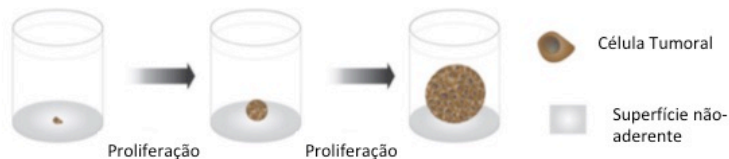
2.4 MODELO ESFEROIDE

O padrão-ouro para avaliar a presença de CTT é o transplante de algumas células com características *stem-like* para camundongos imunocomprometidos. As CTT possuem a capacidade única de formar tumores em ensaios de xenotransplante em série após a injeção de baixo número de células e restabelecer, em cada passagem *in vivo*, a organização hierárquica e heterogeneidade das células do tumor de origem (DUAN et al., 2013).

Alternativamente, métodos *in vitro* foram desenvolvidos como modelos atrativos para avaliar a capacidade de CTT de formar tumoresferas quando plaqueadas em baixa densidade (clonogênico) em condições não aderentes (Fig. 4) (FEDER-MENGUS et al., 2008; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Sendo assim, a formação de esferoides a partir de ensaios tridimensionais (3D) tem sido utilizado para o

enriquecimento de CTT *in vitro* e foi primeiramente descrita por Singh e colaboradores (2003) para tumores cerebrais. No referido estudo, células tronco tumorais cerebrais foram isoladas a partir de esferoides livre-flutuantes exclusivamente a partir da fração celular CD133 positiva. (SHEILA K. SINGH, IAN D. CLARKE, MIZUHIKO TERASAKI, VICTORIA E. BONN, CYNTHIA HAWKINS, JEREMY SQUIRE; DIRKS, 2003).

Figura 4. Modelo de tumoresfera.



Tumoresferas são formadas por proliferação clonal em condições de baixa aderência e com meio de cultura característico. Fonte: adaptado de WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE (2015)

Inicialmente, a quantificação e caracterização de agregados esféricos flutuantes foram realizadas para células-tronco neurais normais cultivadas como neuroesferas, nas quais uma única célula é capaz de dar origem a uma esfera por expansão clonal (REYNOLDS; WEISS, 1992). A partir de então, o modelo de tumoresfera foi aplicado para diversos tipos de tumores sólidos como mama (PONTI et al., 2005), pulmão (ERAMO et al., 2008), próstata (COLLINS et al., 2005) e cólon (RICCI-VITIANI et al., 2007).

Em condições não-aderentes, células desprovidas de característica “*stem-like*” não são capazes de sobreviver enquanto que as células com características similares as das células tronco são capazes de sobreviver e proliferar apenas por interação célula-célula (MIN et al., 2015). Os métodos para isolamento e expansão de CTT como tumoresferas não diferem muito de um tecido tumoral para outro. O primeiro passo requer a dissociação mecânica e enzimática da amostra de tumor em suspensões de células isoladas (essa cultura também pode ser realizada em linhagens celulares imortalizadas, facilitando a etapa de dissociação). Em seguida, esta suspensão de células é cultivada em baixa densidade (WEISWALD; BELLET;

DANGLES-MARIE, 2015). Além disso, o meio de cultura é um componente importante para o cultivo e expansão de CTT *in vitro*. Geralmente, o meio é específico e isento de soro bovino fetal, além de ser suplementado com vários fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (bFGF), o suplemento b27, hidrocortisona, insulina e progesterona. A concentração destes fatores pode variar para diferentes tipos de células bem como os respectivos efeitos (CHAICHANA et al., 2006). Por exemplo, a heparina pode ser utilizada como estabilizador entre a associação do bFGF ao receptor (VENKATARAMAN et al., 1996). Entretanto, existem células tumorais, junto as quais o crescimento de CTT em modelo esferoide é possível com o uso de soro bovino fetal, sem a adição de fatores de crescimento, demonstrando que a adição de meio suplementado pode ser adaptável (MIN et al., 2015).

A formação de esferoides enriquece seletivamente o crescimento de CTT, no entanto é importante ressaltar que as tumoresferas não são estruturas homogêneas enriquecidas com células indiferenciadas, mas compreendem uma gama de entidades morfológicamente distintas que apresentam heterogeneidade molecular inter e intra estrutural, incluindo a expressão variável de marcadores de diferenciação (VERMEULEN et al., 2010).

Uma melhor compreensão da fisiologia das CTT pode explicar as diferentes respostas dos pacientes às terapias antineoplásicas, além de proporcionar uma visão aprimorada do ciclo de vida das células tumorais. Deste modo, o cultivo de CTT utilizando ensaios tridimensionais (3D) podem mimetizar o crescimento tumoral *in vitro*, já que são capazes de aumentar a expressão de genes associados à característica tronco.

2.5 SAIS DE ISOTIURÔNIO

Os sais de isotiourônio formam uma importante classe de compostos com atividades biológicas distintas tais como antiinflamatória (TRANI et al., 1989; VENKATACHALAM et al., 2003), antiviral (VENKATACHALAM; MAO; UCKUN, 2004), herbicida (SALAMA et al., 2015), antibacteriana

(BADAWI; AZZAM; MORSY, 2006; COHEN et al., 2016; TAIT et al., 1988) e antitumoral (KORONKIEWICZ et al., 2012, 2015).

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foi observado que os sais de isotiurônio são capazes de reduzir a expressão do oncogene N-RAS em melanoma, além de diminuir a proliferação e migração celular e ainda levar as células à apoptose (CISILOTTO et al., 2015). Além disso, o brometo de (Z)-2- (isotioureidometil)-2-pentenoato de metila (SI-MF08) apresentou, entre outros compostos SI-derivados estudados, a menor concentração citotóxica para 50 % das células (CC50) e o maior índice de seletividade para células de leucemia, causando alterações celulares que sugerem morte por bloqueio de ciclo celular na fase G2/M, seguido por apoptose (FERREIRA et al., 2017). Na continuidade do estudo, em avaliações *in vivo*, foi observado que o composto SI-MF08 inibiu o crescimento de tumores subcutâneos de melanoma em camundongos C57JBL/Unib, apresentando efeitos antitumorais além de aumentar a taxa de sobrevivência dos animais (ASSUNÇÃO, 2017).

No intuito de prospectar novas moléculas para o tratamento de câncer, que possam atuar mais efetivamente e eventualmente de maneira a evitar recidivas da doença, este projeto, através do uso da criação de um modelo de melanoesfera, propõe a avaliação da atividade do SI-MF08 sobre a população de células tronco tumorais da linhagem de melanoma murino B16F10.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver o modelo de melanoesfera e avaliar o efeito citotóxico do sal de isotiourônio MF08 (SI-MF08) sobre a população de células tronco tumorais.

3.2 Objetivos específicos

- Definir as condições de cultura para o modelo de melanoesfera da linhagem B16F10.
- Avaliar *in vitro* o padrão de expressão dos marcadores de superfície CD133, CD44.
- Verificar *in vitro* o efeito citotóxico do sal de isotiourônio MF08 sobre a linhagem B16F10 em modelo de melanoesfera.
- Avaliar *in vitro* o padrão de expressão dos marcadores de superfície CD133, CD44 da linhagem B16F10 após o tratamento com o sal de isotiourônio MF08 em modelo de melanoesfera;
- Estabelecer uma cultura primária a partir de melanoma induzido em camundongos C57BL/6J/Unib com perspectivas de aprimorar o modelo de melanoesfera.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina, ácido N- [2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) e a tripsina foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI), azul de tripano e o tetróxido de ósmio foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, USA); a agarose foi obtida da Ludwig Biotec Ltda – BR, o hexametildisilazano (HMDS) foi obtido da SPI-chem® (West Chester, PA, EUA), os anticorpos policlonais primários anti-CD44 e anti-CD133 foram obtidos da Abcam (Cambridge, UK) e o anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa488 foi obtido da Invitrogen®(Califórnia, EUA).

4.2 Cultura Celular

A linhagem de melanoma murino B16F10 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco Modified Eagles's Medium* (DMEM) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES e mantidas em garrafas plásticas de cultura incubadas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Ao atingirem 80 % de confluência, as células foram subcultivadas através da dissociação enzimática utilizando tripsina 0,25 % durante 5 minutos a 37 °C. Para a realização dos ensaios, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripano sendo possível diferenciar as células viáveis das não viáveis. O corante é internalizado por células que apresentam a membrana plasmática rompida, corando-as de azul. Somente as culturas que apresentaram mais de 95 % de viabilidade (não coradas) foram utilizadas. O tempo de incubação e o número de células plaqueadas foram apropriados para cada experimento.

4.3 Padronização do modelo de melanoesferas

4.3.1 Formação das melanoesferas

Inicialmente, foram testados três diferentes volumes de gel de agarose 2 % (m/v), a fim de obter a melhor condição para formação dos esferoides. A agarose em pó foi dissolvida em água destilada na concentração final de 2 % e solubilizada em banho-maria à temperatura de 87 °C. Após solubilização, o gel foi transferido para placas de 96 poços, nos volumes de 30, 40 e 50 µL/poço. Posteriormente, as placas contendo o gel de agarose foram esterilizadas por radiação UV durante 30 minutos em cabine de segurança biológica e mantidas em incubadora a 37 °C por mais 30 minutos para completa gelificação. Em seguida, as células B16F10 foram plaqueadas numa baixa densidade celular (300 células/cm² – 100 células/poço) em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Após o plaqueamento, as células foram incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera com 5 % CO₂ durante 7 dias. No quarto dia, metade do volume do meio celular foi retirado e substituído por meio fresco. Além disso, fotografias foram feitas em microscópio de luz Nikon Eclipse TS100 (aumento de 100×) no quarto e sétimo dia de cultivo. Após os sete dias, as melanoesferas foram recolhidas para análise.

4.3.2 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular das melanoesferas foi realizada pelo método de exclusão por Azul de Tripano. Após sete dias de cultivo, os esferoides foram transferidos para microtubos, lavados com PBS 1× e dissociados enzimaticamente com tripsina 0,25 % por 5 minutos a 37 °C. As células dissociadas foram centrifugadas a 800× g por 10 minutos. O *pellet* formado foi suspenso com meio de cultura DMEM e corado com Azul de Tripano. A contagem de células totais, viáveis e inviáveis foi realizada em câmara de Neubauer e os valores foram transformados em porcentagem de células viáveis e inviáveis.

4.3.3 Tamanho da melanosfera

O crescimento das melanosferas foi avaliado através das medidas de área em μm^2 de cada esferoide no quarto e sétimo dia de cultivo. Os esferoides foram fotografados em microscópio de luz Nikon Eclipse TS100 pelo *software ScopePhoto 3.0* no aumento de 100 \times e a área foi medida pelo *software ImageJ* através do delineamento do contorno esferoide.

4.3.4 Morfologia da melanosfera

As melanosferas formadas nos diferentes volumes de agarose 2 % testados foram analisadas morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura. Para esta metodologia, as melanosferas foram transferidas para microtubos, lavadas com PBS 1 \times e fixadas durante 30 minutos com solução de paraformaldeído 4 % + glutaraldeído 2,5 %. A etapa de fixação foi seguida por recobrimento com tetróxido de ósmio por uma hora, lavadas com água destilada e desidratadas com álcool etílico por 10 minutos em concentrações crescentes de 80 %, 90 %, 96 % e 100 %. As melanosferas foram então incubadas com hexametildisilazano (HMDS), diluído em álcool absoluto (1:1), por 15 minutos seguido de duas novas incubações de 15 minutos cada com HMDS puro. Posteriormente, as melanosferas foram transferidas para uma membrana de carbono adesivo e mantidas em dessecador até completa evaporação, recobertas com partículas de ouro e analisadas no microscópio de varredura JEOL JSM-6390LV *Scanning Electron Microscope* disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC).

4.4 Avaliação de marcadores de superfície

4.4.1 Microscopia Confocal

A expressão de CD133 e CD44 foi observada por microscopia confocal tanto em melanosferas quanto em células crescidas em monocamada (2D). Após sete dias de cultura, as melanosferas foram recolhidas, lavadas com PBS e fixadas

com paraformaldeído 2 %. As células de cultura 2D de B16F10 foram dissociadas com tripsina 0,25 % (10 min, 37 °C), centrifugadas durante 10 min a 800 × g e plaqueadas em placa de cultura de 35 mm específica para microscopia confocal, com lâmina no fundo. Tanto as melanosferas quanto as células em 2D foram incubadas com PBS contendo 5 % de SFB durante 30 min e incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo policlonal primário CD44 (1:100 em PBS) e CD133 (1:100 em PBS). Posteriormente as melanosferas e as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa-488 (1:400 em PBS – excitação 490 nm) no escuro durante uma hora. Então, o anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo foi removido e os núcleos celulares foram corados com DAPI (1:1000 em PBS – excitação 405 nm) à temperatura ambiente durante 10 min no escuro. O controle negativo foi composto por células marcadas apenas com anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa-488 para identificar a fluorescência de fundo. As melanosferas foram analisadas em microscópio confocal Leica DMI6000 B e as imagens obtidas foram analisadas no *software* LAS AF Lite.

4.4.2 Citometria de Fluxo

A porcentagem de células que expressam CD133 e CD44 foi avaliada tanto em melanosferas quanto em células em monocamada. As melanosferas (após sete dias de cultura) e as células B16F10 foram dissociadas com tripsina 0,25 % (10 min, 37 °C) e centrifugadas durante 10 min a 800 × g. Para cada condição foram recolhidas aproximadamente 30 melanosferas. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi fixado com paraformaldeído 2 % (20 min a 25 °C) e incubado com PBS contendo 5 % de FBS durante 30 min. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS após nova centrifugação e separadas em quatro tubos (branco, controle negativo, CD44 e CD133). Ambos os tubos, correspondentes a CD44 e CD133, foram incubados *overnight* à 4 °C com anticorpos policlonais primários anti-CD44 (1:100 em PBS) e anti-CD133 (1:100 em PBS), respectivamente. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa-488 (1:400 em PBS) no escuro durante uma

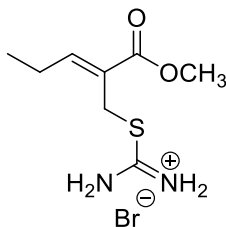
hora. O controle negativo foi composto por células marcadas apenas com anti-IgG conjugado ao fluorocromo para identificar a fluorescência de fundo. Tipicamente, foram analisadas 10.000 células por amostra. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences) e analisada no *software* Flowing 2.5. No Apêndice B encontra-se o modelo de *dot plots* e histograma representativos das análises realizadas.

4.5 Tratamento com SI-MF08

4.5.1 Composto

O sal de isotiurônio MF08 (IS-MF08) foi sintetizado pelo Dr. Misael Ferreira e fornecido pelo Professor Dr. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (Figura 5).

Figura 5. Estrutura do sal de isotiurônio MF08.



Fonte: (FERREIRA et al., 2017)

4.5.2 Condições de incubação das melanoesferas

As células B16F10 foram plaqueadas em baixa densidade celular (300 células/cm²) em placa de 96 poços revestida com 30 µL de gel de agarose 2 %. Após quatro dias de incubação, metade do volume de meio celular (100 µl) foi substituído pelo mesmo volume de meio novo (DMEM + 10% SFB) contendo diferentes concentrações de SI-MF08 (9, 17,5 e 35 µM). Após a exposição ao composto, as melanoesferas foram incubadas por 72 h a 37 °C e atmosfera com 5% CO₂ (sete dias

de cultivo). O controle negativo (CN) foi composto por melanosferas que não foram expostas ao composto.

4.5.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.

4.5.4 Tamanho da melanosfera

O crescimento das melanosferas foi avaliado conforme descrito no item 4.3.3

4.5.5 Avaliação de marcadores de superfície

A quantificação de células positivas para CD133 e CD44 após exposição ao SI-MF08 foi realizada por citometria de fluxo conforme descrito no item 4.4.2

4.6 Cultura primária de células tumorais retiradas de tumores induzido por células B16F10.

4.6.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFSC sob o número PP00892.

4.6.2 Animais

Para o modelo de indução de tumor foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6J/Unib fêmeas com aproximadamente 8-10 semanas de idade e peso de 20 ± 2 g, obtidos no Biotério da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (São Paulo). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (15×36×30 cm) forradas com serragem, substituída a cada três dias para manutenção e higiene das gaiolas. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e comida, em ambiente com temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.6.3 Modelo de indução de tumor

As células B16F10 mantidas em cultura foram tripsinizadas e injetadas por via subcutânea no dorso dos animais na densidade de 5×10^4 em um volume de aproximadamente 100 μL de solução fisiológica estéril (OVERWIJK; RESTIFO, 2001). Os animais foram monitorados até crescimento tumoral no espaço subcutâneo. Após crescimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados e o tecido tumoral foi coletado, mantido em criotubo contendo meio de congelamento (DMEM suplementado com 50 % SBF + 10 % DMSO) e armazenado em nitrogênio líquido até o processamento.

4.6.4 Cultura celular primária a partir de tecido tumoral congelado

Após descongelamento, o tecido tumoral foi lavado uma vez com PBS e macerado para a obtenção de pequenos pedaços. Para a completa dissociação do tecido, o conteúdo previamente macerado foi incubado com tripsina 0,25 %, a 37 °C por 10 minutos. A solução contendo as células foi então centrifugada a $800 \times g$ por 10 minutos e, após centrifugação, o *pellet* foi suspenso em DMEM + 20% SBF e transferido para placa de 12 poços. Durante os sete primeiros dias de cultura, as células foram tratadas com 20 mg/mL de ciprofloxacino para eliminar contaminações provenientes do momento da coleta. Após descontaminação, as células foram mantidas em placa até a observação de pequenas colônias e só então foram tripsinizadas e transferidas para garrafas plásticas de cultura contendo meio DMEM 10 % SBF.

4.6.5 Formação dos esferoides

As células obtidas após o estabelecimento da cultura primária foram plaqueadas em baixa densidade celular (300 células/cm² – 100 células/poço) em placa de 96 poços revestida com 30 μL de gel de agarose 2 %, como descrito no item 4.3.1

4.6.6 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.

4.6.7 Tamanho das melanoesferas

O crescimento das melanoesferas foi avaliado conforme descrito no item 4.3.3

4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão e os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata. Para a análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism® utilizando o teste t-Student ou a análise de variância ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey. Resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do modelo de melanosferas

Os modelos de formação de esferas para estudos de células tronco tumorais apresentam diversas variações metodológicas entre si, tais como: composição e volume do meio, densidade celular, área de crescimento e duração da cultura celular (CHAICHANA et al., 2006). Baseados em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (SALEH, 2017), em que o gel de agarose 2 % foi utilizado para impedir a adesão celular e favorecer a formação de esferas, neste trabalho foi avaliada inicialmente a capacidade de formação de esferoides da linhagem de melanoma B16F10 em diferentes volumes do gel de agarose 2 % (30, 40 e 50 μ l) e em baixa densidade celular.

Baseando-se nos dados da Tabela 1 e da Figura 6, foi possível observar que a linhagem B16F10 foi capaz de formar pequenos esferoides (1 esferoide/100 células) após quatro dias e de manter-se em cultura até o sétimo dia nos três volumes de gel de agarose 2 % testados: 30, 40 e 50 μ L, respectivamente. Foi também observado um aumento significativo na área dos esferoides medidos no 7^o dia quando comparado ao 4^o dia de cultivo (Fig. 7A).

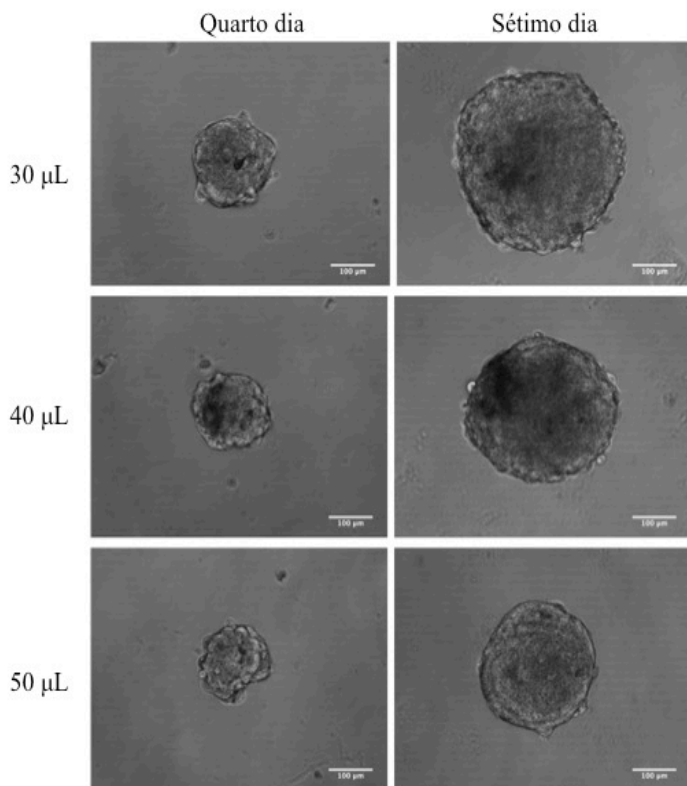
Tabela 1. Área das melanosferas em função do volume de gel de agarose 2 % e do tempo de cultivo

Volume de gel de agarose 2%	Área dos esferoides no 4 ^o dia (μm^2)	Área dos esferoides no 7 ^o dia (μm^2)
30	34100 \pm 7230	146460 \pm 38240
40	27500 \pm 4220	100260 \pm 21500
50	23200 \pm 3520	78000 \pm 23250

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

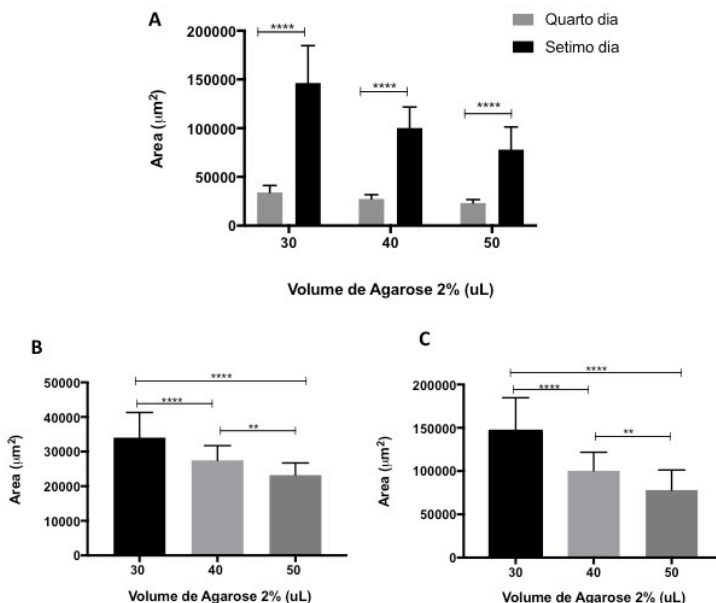
Quando analisados individualmente, é possível observar que os esferoides formados em 30 μ L de gel de agarose 2 % apresentam uma área significativamente maior em comparação aos outros volumes tanto no 4^o (Fig. 7B) como no 7^o (Fig. 7C) dia de cultivo.

Figura 6. Melanoesferas obtidas em função do volume de gel de agarose 2 % e do tempo de cultivo.



Imagens representativas das melanoesferas obtidas por microscopia ótica no quarto e sétimo dia de cultivo nos diferentes volumes de agarose 2 % testados. Barra de escala: 100 µm, magnificação 100 ×.

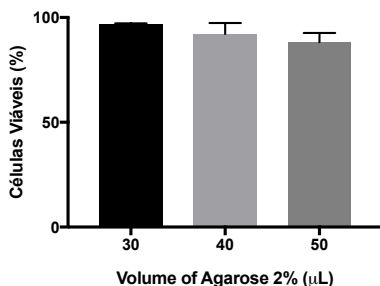
Figura 7. Área das melanoesferas no quarto e sétimo dia de cultivo.



Representação gráfica da área das melanoesferas: A) Comparação entre o quarto e o sétimo dia de cultivo nos três volumes de gel de agarose 2 % testados. Teste estatístico t-student pareado. B) Representação gráfica da área do esferoide obtida no quarto dia. Teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. C) Representação gráfica da área do esferoide obtida no sétimo dia. Teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. **($p < 0,001$) ***($p < 0,0001$), $n = 3$.

Em seguida, foi realizado o ensaio com Azul de Trypan para determinar a taxa de viabilidade das células presentes no modelo de cultura tridimensional. Os esferoides formados nos diferentes volumes de gel de agarose 2 % (30, 40 e 50 µL) foram capazes de manter alta viabilidade celular com 96 %, 92 % e 88 % em cada condição, respectivamente (Fig. 8). Não houve diferença significativa entre os volumes testados, entretanto é possível observar uma tendência na diminuição da viabilidade conforme aumenta-se o volume do gel.

Figura 8. Viabilidade celular das melanoesferas.



Representação gráfica da viabilidade celular nos diferentes volumes de gel de agarose 2 % testados. Teste estatístico ANOVA de uma via. $n = 3$

Pelo método de Azul de Trypan também foi possível quantificar o número de células totais (viáveis + não viáveis) por esferoide nos três volumes de gel de agarose 2 % (Tabela 2). Foi observado que os esferoides formados em 30 μL de gel apresentaram maior número de células em relação aos esferoides formados em 40 e 50 μL . Esses achados complementam os resultados vistos na medida da área, indicando que a maior área observada na melanoesfera formada em 30 μL é proporcional ao número de células .

Tabela 2. Número de células totais em função do volume de gel de agarose 2 %

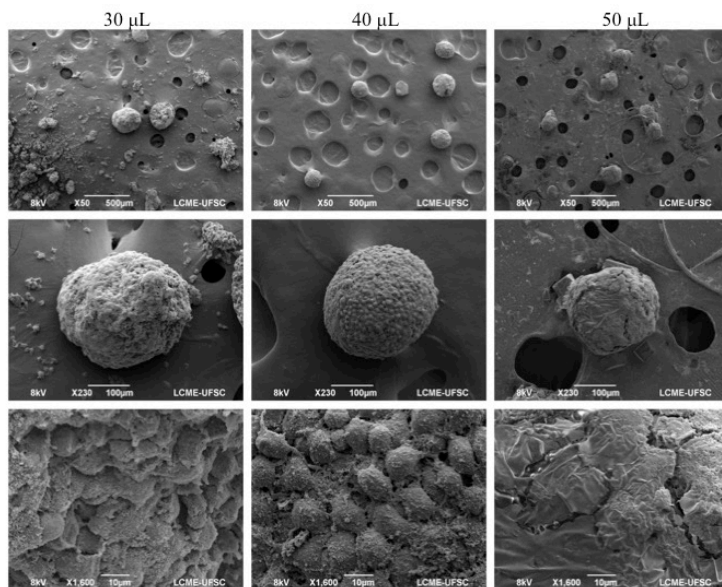
Vol. gel de agarose (μL)	Nº de células viáveis/melanoesfera	Nº de células não-viáveis/melanoesfera
30	6800 \pm 1000	265 \pm 20
40	2900 \pm 730	160 \pm 90
50	2050 \pm 680	200 \pm 20

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

Por fim, para analisar a superfície do esferoide em cada condição, foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura, em que foi possível observar interações célula-célula

e potenciais diferenças morfológicas decorrentes dos diferentes volumes de gel de agarose 2 % (Figura 9).

Figura 9. Morfologia superficial das melanoesferas.



Micrografias representativas das melanoesferas formadas após sete dias de cultivo em 30, 40 e 50 μL de gel de agarose 2 %, apresentados em diferentes aumentos. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Magnificações utilizadas: 50 \times , 230 \times e 1,600 \times

É possível observar que ao final do sétimo dia de cultura, os esferoides apresentaram diferentes morfologias superficiais nas três condições testadas. As melanoesferas obtidas com 30 e 40 μL apresentam superfície mais rugosa, sendo possível a identificação das células isoladamente devido a fraca/limitada adesão celular. Em contrapartida, as melanoesferas formadas com 50 μL apresentam superfície mais lisa e que não permite a identificação das células, sugerindo uma maior adesão e compactação celular.

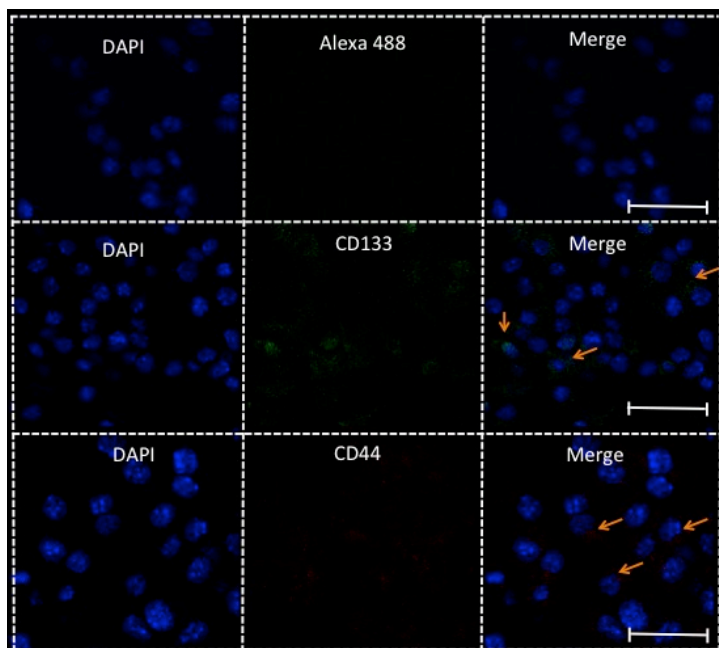
Portanto, em função dos resultados obtidos pelos ensaios de viabilidade, quantificação e morfologia celular, o volume de 30 μL de gel de agarose 2 % tem mostrado ser a condição ideal para o modelo de melanoesfera, por formar

esferoides com um grande número de células e alta viabilidade celular quando comparado aos outros volumes. Assim sendo, os demais experimentos foram realizados utilizando 30 μ L de gel de agarose 2 % para o revestimento da placa.

5.2 Avaliação de marcadores de superfície associados com CTT

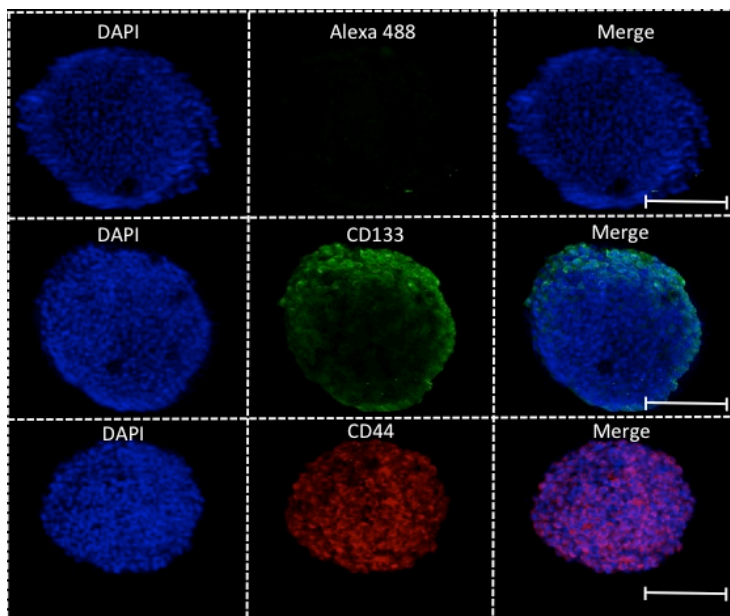
Para investigar se a formação de melanoesferas nas condições empregadas foi capaz de enriquecer a população de células com características *stem-like*, dois marcadores de superfície associados com o perfil visto em células tronco tumorais foram escolhidos: CD133 e CD44. Através de imagens obtidas por microscopia confocal foi possível identificar células CD133 e CD44 positivas em cultura em monocamada (2D) de B16F10 (setas laranja) (Fig. 10), bem como em melanoesferas (Fig. 11).

Figura 10. Visualização da presença e marcadores de superfície associados com CTT em B16F10.



Imagens obtidas por microscopia confocal de cultura em monocamada-2D: Marcação nuclear com DAPI (azul); Controle (Alexa 488); Células CD133 positivas (verde); Células CD44 positivas (Vermelho). Barra de escala: 50 μm . Magnificação: 100 \times

Figura 11. Visualização da presença de marcadores de superfície associados a CTT em melanosferas.

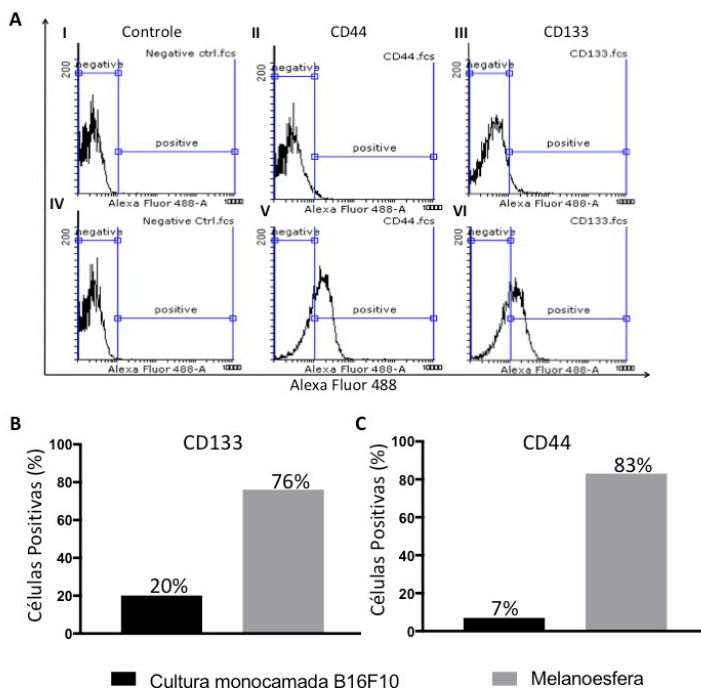


Imagens representativas de projeções máximas obtidas por microscopia confocal de melanosferas: Marcação nuclear com DAPI (azul); Controle (Alexa 488); Células CD133 positivas (verde); Células CD44 positivas (Vermelho). Barra de escala: 50 μm . Cortes de 1 μm .

Posteriormente, a quantificação de células CD133 e CD44 positivas em cultura 2D de B16F10 e em melanosferas (3D) foi realizada por citometria de fluxo (Fig. 12A). A análise foi realizada com aproximadamente 30 melanosferas por condição.

Como observado na Figura 12B, 20 % das células foram positivas para CD133 em cultura 2D, enquanto que em melanosferas a porcentagem de células positivas aumentou para 76 %. O mesmo ocorreu com as células CD44 positivas, em que 7 % da população foi positiva em cultura 2D e em melanosferas a porcentagem aumentou para 83 % (Fig. 12C).

Figura 12. Quantificação de células CD133 e CD44 positivas.



A) Histogramas representativos da quantificação de células CD133 e CD44 marcadas com Alexa Fluor 488. Cultura em monocamada de B16F10: controle (I), CD133 (II) e CD44 (III) e de Melanoesferas: controle (IV), CD133 (V) e CD44 (VI). B) Representação gráfica da quantificação de CD133. C) Representação gráfica da quantificação de CD44.

5.3 Investigação da atividade antitumoral do SI-MF08 em melanoesferas

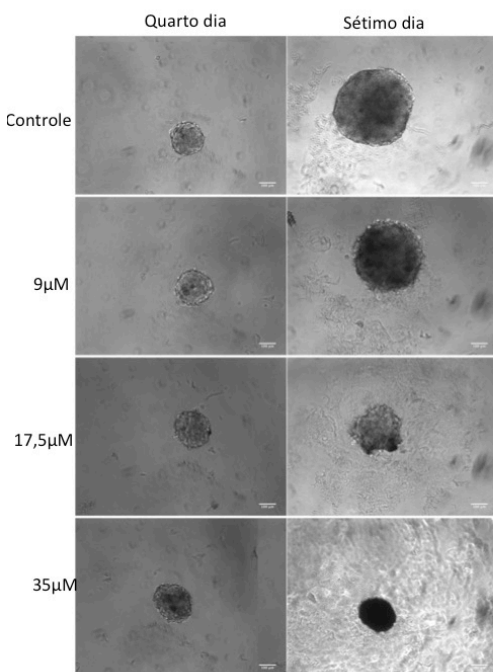
Após a confirmação de que o modelo de melanoesfera é capaz de aumentar a porcentagem de células CD133 e CD44 positivas, foi iniciada a avaliação da atividade antitumoral do sal de isotiourônio MF08.

Após quatro dias de incubação, as melanoesferas foram expostas a três concentrações diferentes de SI-MF08 (9 μ M,

17,5 μM e 35 μM) e incubadas novamente por mais três dias até que se completasse sete dias de cultivo. O controle negativo foi composto por melanosferas que não foram expostas ao SI-MF08. Como visto na Figura 13, ao final do sétimo dia, é possível notar diferenças de tamanho entre as melanosferas controle as melanosferas que foram expostas ao composto.

Quando comparadas a área do sétimo dia com a do quarto dia de cultura, é possível observar um aumento significativo ($p < 0.0001$) na área no controle (Fig. 14A) e em proporções menores que no controle conforme o aumento da concentração do composto, nos esferóides expostos a 9 μM (Fig. 14B) e 17,5 μM (Fig. 14C). No entanto, a exposição a 35 μM de SI-MF08 impediu quase completamente o aumento da área do esferóide (Fig. 14D).

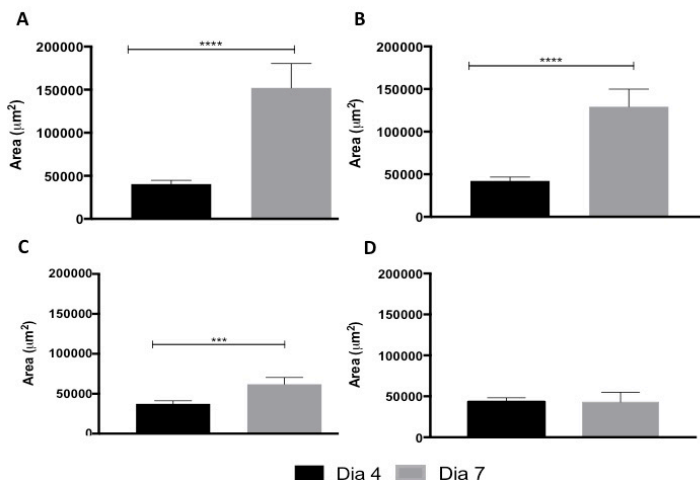
Figura 13. Melanosferas obtidas após exposição ao SI-MF08



Imagens representativas das melanosferas obtidas por microscopia ótica no quarto e sétimo dia de cultivo após exposição a diferentes

concentrações de SI-MF08. Barra de escala: 100 μm , magnificação 100 \times .

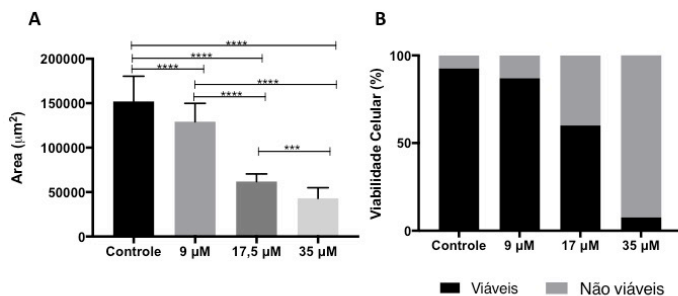
Figura 14. Efeito do SI-MF08 em melanosferas no quarto e sétimo dia de cultivo.



Representação gráfica das áreas (μm^2) das melanosferas após exposição ao SI-MF08 por quatro e sete dias de cultivo: A) controle B) 9 μM de SI-MF08. C) 17,5 μM de SI-MF08. D) 35 μM de SI-MF08. Teste estatístico t-student pareado. **** ($p < 0,0001$) *** ($p < 0,001$).

Adicionalmente, ao final do sétimo dia de cultura, a exposição a 9 μM , 17,5 μM e 35 μM de SI-MF08 foi capaz de inibir significativamente o crescimento das melanosferas em 15 %, 59 % e 70 %, respectivamente (Fig. 15A). Em relação à viabilidade celular, o grupo controle e o grupo exposto a 9 μM de SI-MF08 apresentaram alta porcentagem de células viáveis (93 % e 87 %, respectivamente). Por outro lado, as maiores concentrações do composto apresentaram menor porcentagem de células viáveis, sendo 60 % para os esferóides incubados com 17,5 μM e apenas 8 % para os incubados com 35 μM de SI-MF08 (Fig. 15B).

Figura 15. Viabilidade e efeito do SI-MF08 em melanosferas no sétimo dia de cultivo.



Representação gráfica de: A) Área das melanosferas no sétimo dia de cultivo. Teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós-teste tukey. B) Porcentagem de células viáveis e não viáveis. **** (p < 0,0001) *** (p < 0,001)

Considerando o número total de células (Tabela 3), pode-se observar que os esferóides controle e os expostos a 9 µM do composto, exibiram maior número de células por melanosfera enquanto que os expostos a 17,5 µM e 35 µM de SI-MF08 apresentaram aproximadamente 2000 células/melanosfera. Esses resultados corroboram com o que foi encontrado nas medidas de área das melanosferas.

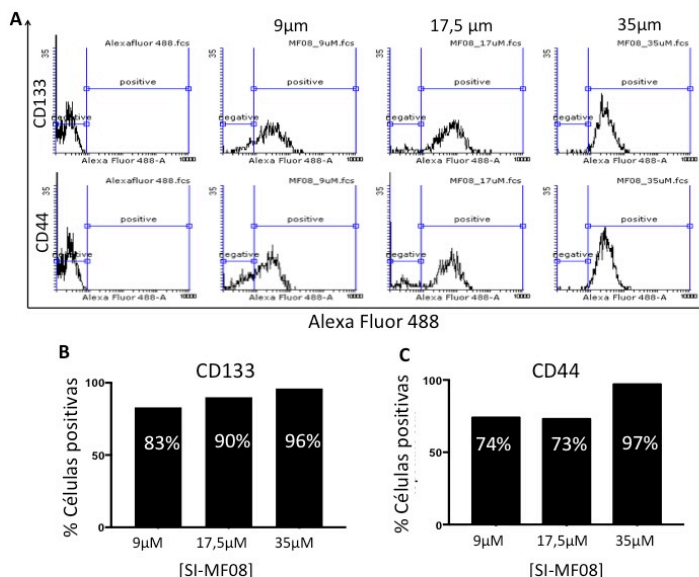
Tabela 3 Número de células totais após exposição a diferentes concentrações de SI-MF08

	Células viáveis/ melanosfera	Células não viáveis/ melanosfera	Total
Controle	7778	622	8400
9 µM	6595	985	7580
17,5 µM	1200	800	2000
35 µM	185	1815	2000

Por fim, quanto à presença de células CD133 e CD44 positivas, a análise por citometria de fluxo (Fig. 16) mostrou que a porcentagem de células positivas permaneceu alta, representando 83 %, 90 % e 96 % para CD133 (Fig. 16B) e 74 %, 73 % e 97 % (Fig. 16C) para CD44 após incubação com 9 µM, 17,5 µM e 35 µM de SI-MF08, respectivamente. Como

visto anteriormente, as melanoesferas na ausência do composto apresentaram 76 % e 83 % de células positivas para CD133 e CD44, respectivamente.

Figura 16. Quantificação de células CD133 e CD44 positivas após exposição a SI-MF08.



A) Histogramas representativos de quantificação de células CD133 e CD44 positivas marcadas com Alexa Fluor 488 após exposição a diferentes concentrações de SI-MF08. B) Representação gráfica, em porcentagem, da quantificação de células CD133 positivas após exposição a diferentes concentrações de SI-MF08. C) Representação gráfica, em porcentagem, da quantificação de células CD44 positivas após exposição a diferentes concentrações de SI-MF08.

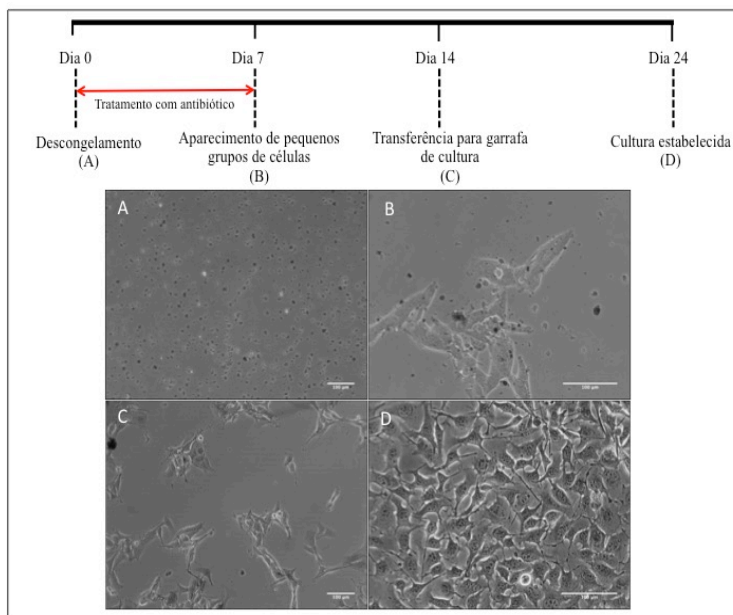
5.4 Obtenção de melanoesferas a partir de cultura primária

O modelo de cultura primária (CP) a partir de tecidos tumorais tem sido utilizado em pesquisa por apresentar vantagens como controle das condições da amostra e cultura, além de semelhanças com o tecido de origem, sendo capaz de

reproduzir a heterogeneidade do mesmo. Além disso, os modelos de cultura primária evitam possíveis variações fenotípicas que podem acontecer com a passagem de células em culturas imortalizadas ao longo do tempo (WELTE et al., 2013).

Neste estudo, as culturas primárias foram produzidas a partir de tecido tumoral de camundongos C57BL/6J/Unib crescido após injeção de células de melanoma B16F10. Após crescimento tumoral, os animais foram anestesiados e eutanasiados e o tecido tumoral foi coletado. O tecido foi mantido em criotubo contendo meio de congelamento e armazenado em nitrogênio líquido até o processamento. A Figura 17 representa uma linha do tempo com os principais eventos entre o descongelamento e o estabelecimento da cultura primária, bem como as imagens obtidas em tempos crescentes de cultivo.

Figura 17. Linha do tempo do estabelecimento da cultura primária.

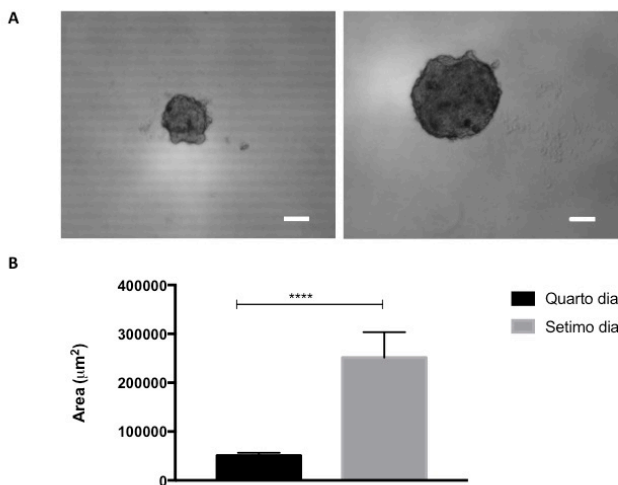


Micrografias obtidas por microscopia de luz representativas do crescimento da cultura primária. A) Dia 0, descongelamento. B) Dia 7, surgimento de grupos de células. C) Dia 14, transferência da cultura para garrafas. D) Dia 24, estabelecimento da cultura primária

Logo após o descongelamento, é possível observar muitos restos celulares e hemácias (Fig.15A). Durante a primeira semana de cultivo foi realizado tratamento com antibióticos e ao final dos sete primeiros dias foi possível a visualização de pequenos grupos de células (Fig.15B). A cultura seguiu em placa por mais sete dias com a troca de meio sendo realizada quando necessário. Após a transferência para garrafas plásticas, a cultura celular apresentou um crescimento com característica de formação de colônia (pequenos grupos de células) e morfologia celular semelhante à B16F10, como pode ser observado na Figura 15C. O estabelecimento da cultura, ocorreu após 24 dias de cultivo em que foi possível observar a confluência celular (Fig. 15D).

Após esta etapa, foi realizado o ensaio de formação do esferoide em condições não aderentes com 30 μL de gel de agarose 2% em baixa densidade celular, como determinado anteriormente (Fig. 16A). O tamanho do esferoide está representado na Figura 16B através da medida da área em μm^2 em que é possível observar um aumento de aproximadamente 4 \times na área dos esferoides medidos no 4^o dia quando comparado ao 7^o dia de cultivo, indicando uma alta taxa de proliferação celular.

Figura 18. Crescimento das melanosferas obtidas a partir de cultura primária.



Imagens representativas de: A) melanosferas no quarto (esquerda) e sétimo (direita) dia de cultivo. B) Representação gráfica da medida de área em μm^2 das melanosferas no quarto e sétimo dia de cultivo. Barra de escala: 100 μm . Magnificação: 40 \times . Teste estatístico t-student pareado. **** ($p < 0,0001$)

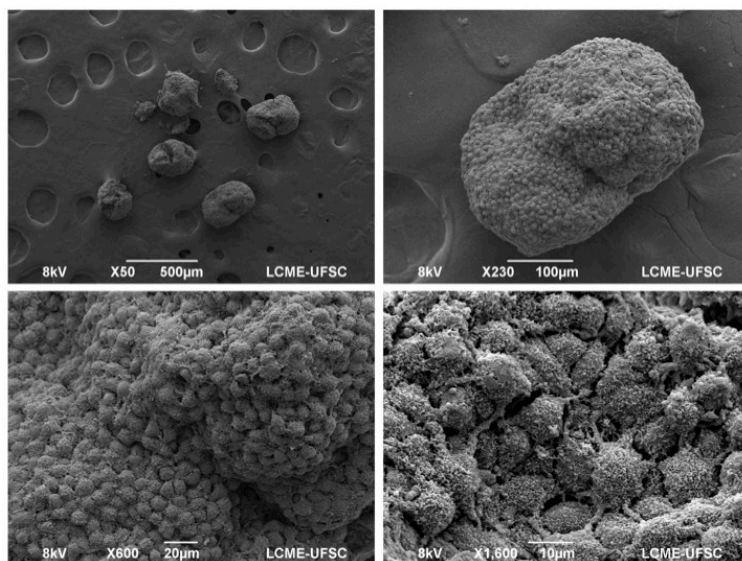
Em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por coloração com Azul de Trypan. Os esferoides de cultura primária apresentaram alta viabilidade, com 96 % de células viáveis. Além disso, também foi possível quantificar o número de células totais (viáveis + não-viáveis) por melanosfera (Tabela 4).

Tabela 4. Quantificação do número de células por melanosfera

Número de células viáveis/melanosfera	Número de células não-viáveis/melanosfera	Total
8156	312	8468

A análise morfológica da superfície do esferoide através de microscopia eletrônica de varredura também foi realizada (Fig. 19). É possível observar que ao final do sétimo dia, os esferoides apresentam-se bem delineados e firmes. Além disso, nota-se que as células são bem visíveis individualmente e encontram-se justapostas evidenciando interações célula-célula.

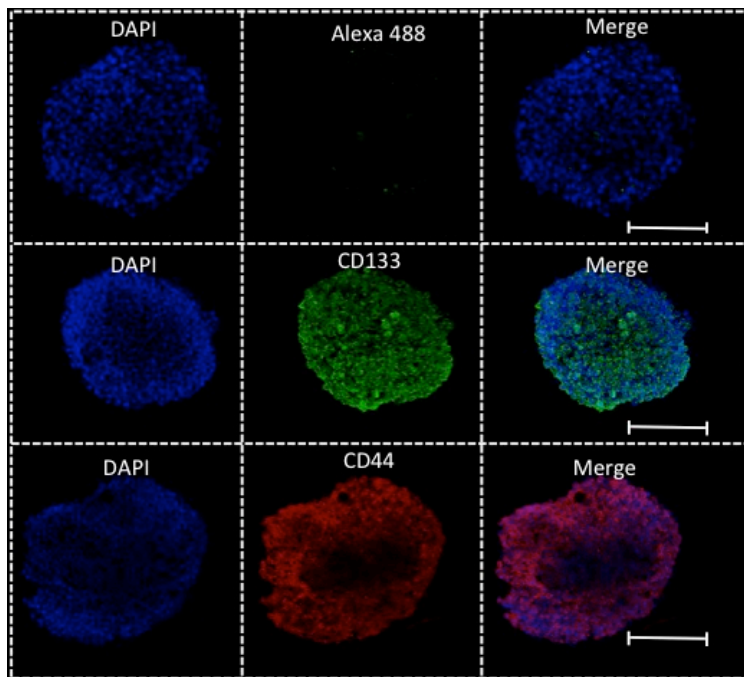
Figura 19. Análise morfológica das melanoesferas realizada por microscopia eletrônica de varredura.



Micrografias representativas das melanoesferas formadas após sete dias de cultivo em 30 µL de gel de agarose 2% em diferentes aumentos: 50 ×, 230 ×, 600 × e 1600 ×.

Em relação a presença de marcadores associados a presença de células tronco tumorais, também foi possível identificar células CD133 e CD44 positivas através de microscopia confocal (Fig. 20).

Figura 20. Visualização da presença de marcadores de superfície associados a CTT em melanoesferas formadas a partir de cultura primária.



Imagens representativas de projeções máximas obtidas por microscopia confocal de melanoesferas: Marcação nuclear com DAPI (azul); Controle (Alexa 488); Células CD133 positivas (verde); Células CD44 positivas (Vermelho). Barra de escala: 50 μm. Cortes de 1 μm.

6 DISCUSSÃO

As células tronco tumorais representam uma subpopulação celular que é caracterizada por apresentar maior resistência à quimioterapia e radioterapia. Consequentemente, as abordagens antitumorais convencionais frequentemente não conseguem erradicá-las (FRANK; SCHATTON; FRANK, 2010). Como as CTT são cruciais para a tumorigênese, crescimento tumoral, metástase e recorrência, é necessário estabelecer modelos de cultura que mimetizem as condições encontradas *in vivo*. Neste sentido, ensaios tridimensionais são conhecidos por melhor simular as condições celulares *in vivo* em comparação com os sistemas tradicionais de cultura de células em monocamada e assim, influenciar a formação de células com características *stem-like* (BIELECKA et al., 2016).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método de cultura tridimensional para melanoma, aqui chamada de melanoesfera, para enriquecimento de células positivas para os marcadores CD133 e CD44, descritos na literatura frequentemente associados ao aparecimento CTT e assim, desenvolver um modelo de estudo que considere a eficácia de novos fármacos com possíveis propriedades antitumorais frente a essa população de células de modo a complementar os estudos de citotoxicidade 2D.

O método tradicional de cultura de esferoides para enriquecimento de células tronco tumorais baseia-se no modelo de neuroesferas em que agregados esféricos flutuantes foram desenvolvidos para células-tronco neurais normais, nas quais uma única célula é capaz de dar origem a um esferoide por expansão clonal (REYNOLDS; WEISS, 1992). Normalmente, o meio de cultura utilizado para esse tipo de crescimento é desprovido de SBF e suplementado com fatores que favorecem o crescimento das células-tronco, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), e de fibroblastos (bFGF) bem como hidrocortisona, insulina e progesterona, dependendo do tipo celular a ser estudado (CHAICHANA et al., 2006; YANG; IMRALI; HEESCHEN, 2015).

Neste estudo, não foi utilizado meio de cultura suplementado com fatores de crescimento. A cultura foi realizada em condições padrão para cultivo de B16F10 com

DMEM suplementado com 10 % SBF. Min e colaboradores (2015) já haviam demonstrado que esferoides de carcinoma hepatocelular proliferam tanto em meio de cultura suplementado com fatores de crescimento quanto em meio sem suplementação. Portanto, um meio de cultura livre de fatores de crescimento é uma ferramenta adaptável, eficiente e econômica para o cultivo *in vitro* de CTT. Consequentemente, este é o primeiro trabalho a avaliar o enriquecimento de melanoesferas para CD133 e CD44 sem o uso de meios de diferenciação.

Outro fator considerado para a formação de esferoides de CTT é a densidade celular. A densidade celular de até 20 células/ μL é considerada uma condição necessária para o crescimento de esferoides não por agregação, mas sim por expansão clonal (SINGEC et al., 2006). Aqui, foi utilizada uma densidade celular menor que <1 célula/ μL (3×10^2 células/ cm^2) a fim de propiciar a formação do esferoide por expansão clonal.

Baseados em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa envolvendo a formação de esferoide multicelular 3D, foi escolhido para este modelo o gel de agarose 2 % para impedir a adesão celular e oferecer uma condição flutuante a cultura (SALEH, 2017). A avaliação do modelo de melanoesfera teve início com a padronização do volume de gel de agarose 2% para o revestimento da placa. Deste modo, foram testados três diferentes volumes (30, 40 e 50 μL) e foi observado que a formação dos esferoides ocorreu independentemente do volume de gel utilizado e, nas três condições, os esferoides foram formados no quarto dia e mantidos em cultura até o sétimo dia.

Em modelo semelhante relatado na literatura, esferoides formados em 50 μL de gel de agarose 2 % com densidade celular de $1,2 \times 10^3$ células por poço apresentaram ao final do sétimo dia de cultivo em torno de 2.200 células e viabilidade celular de 71 % (SALEH, 2017). Aqui, as melanoesferas formadas em 50 μL de gel também apresentaram cerca de 2.000 células viáveis ao final do sétimo dia cultivo. Porém, é importante destacar que a densidade celular inicial foi de 1×10^2 por poço, cerca de $120 \times$ menor do que a utilizada por Saleh (2017). Ainda, o sistema estudado apresentou alta quantidade de células viáveis nas três condições testadas com destaque para as melanoesferas formadas em 30 μL de agarose 2 % que apresentaram tanto tamanho quanto número de células totais

significativamente maior do que as melanoesferas formadas nos outros volumes.

Não foi encontrado na literatura trabalhos que avaliem a influencia do volume do gel de agarose na formação e tamanho do esferoide. No entanto, baseados nas observações experimentais (acompanhar o crescimento da melanoesfera dia-a-dia), propõe-se com este estudo que o volume de gel utilizado altera o formato final do poço, possibilitando ou não maior interação, contato e agregação celular. Sendo assim, no volume maior (50 μ L) as células ficam mais afastadas umas das outras, dificultando agregação celular enquanto que no volume menor (30 μ L) as células ficam mais próximas. Ainda, nesta condição, após gelificação da agarose, o poço apresenta uma leve concavidade, facilitando o contato célula-célula. Portanto, nestas condições, a formação das melanoesferas ocorre tanto por agregação celular quanto por expansão clonal e apesar da falta de literatura no assunto, o volume de gel de agarose é um fator a ser considerado no desenvolvimento de culturas tridimensionais.

Portanto, em função dos resultados obtidos através dos ensaios de viabilidade, quantificação e morfologia celular, o volume de 30 μ L de agarose 2 % foi considerado ideal para a formação de melanoesferas e foi o escolhido para dar continuidade ao estudo.

O próximo passo foi a avaliação da presença de marcadores de superfície associados a células tronco tumorais, tanto em monocultura quanto em melanoesfera. O modelo de melanoesfera foi capaz de aumentar aproximadamente 4 \times e 12 \times a porcentagem de células positivas para CD133 e CD44, respectivamente, o que sugere que a organização tridimensional é capaz de modular a presença destes marcadores. Este resultado difere dos achados por Calvet e colaboradores (2014), em que o modelo esferoide não foi capaz de aumentar a porcentagem de células positivas para CD133 e CD44. Vale ressaltar que as condições de cultura foram diferentes, no estudo de Calvet e colaboradores, os esferoides de B16F10 foram mantidos por apenas 4 dias em meio contendo fatores de crescimento, enquanto que aqui a cultura manteve-se até o sétimo dia, na ausência de fatores de crescimento.

Sztiller-Sikorska e colaboradores (2012) avaliaram a plasticidade de células tumorais em melanoesferas obtidas

através de espécimes de melanoma humano e concluíram que a transição de melanosferas para cultura em monocamada foi acompanhada por uma aparente perda de potencial clonogênico, taxa de proliferação aumentada e expressão alterada de alguns marcadores de superfície celular, incluindo o CD133. Estas mudanças, no entanto, foram reversíveis e, em comparação com as culturas em monocamada, as melanosferas foram enriquecidas com células com potencial clonogênico, refletindo a capacidade de auto-renovação. Além disso, os resultados demonstraram que as células de melanoma podem facilmente mudar de função após exposição a estímulos externos, indicando que as CTT dependem fortemente do microambiente (SZTILLER-SIKORSKA et al., 2012).

De fato, em células de melanoma murino B16F10 foi demonstrado que sob condições de estresse como privação de SFB e oxigênio, a porcentagem da população celular associada a CTT aumenta (MITRUS et al., 2012). Ohinishi e colaboradores (2014), em modelo de glioblastoma, demonstraram que o aumento de expressão de células CD133 positivas pode estar relacionado ao microambiente celular como a baixas concentrações de oxigênio e nutrientes. Deste modo, a privação de oxigênio provocada pelo modelo esferoide em que a concentração de nutrientes e oxigênio é maior na região mais externa (ZANONI et al., 2016) pode explicar o aumento de células positivas tanto para CD133 quanto para CD44 encontradas neste estudo.

A baixa densidade celular associada ao crescimento tridimensional induz à uma proliferação diferencial, ou seja, as células dividem-se mais rapidamente na periferia do esferoide devido à falta de moléculas de adesão celular. Isto, por sua vez, é causado pela perda de polaridade pelas células tronco tumorais durante o processo de transição epitélio-mesenquimal. Do mesmo modo, a porcentagem de marcadores associados a CTT é frequentemente maior em modelos 3D (CHANG et al., 2013; KELM et al., 2003).

Modelos tridimensionais de estudo de células tronco tumorais, quando comparados com modelos em monocamada, representam melhor o microambiente tumoral, facilitam a formação de matriz extracelular, exibem taxas de proliferação mais adequadas com morfologia celular mais representativa,

estimulam a expressão de genes relacionados à característica tronco além de permitirem uma resposta mais realista frente a agentes antitumorais (BIELECKA et al., 2016).

Os resultados obtidos até o momento mostram que o modelo de melanoesferas aqui desenvolvido apresenta alta viabilidade celular, proliferação e alta porcentagem de células CD133 e CD44 positivas, mesmo sem a presença de meio de diferenciação. Neste contexto, após a caracterização do modelo de melanoesfera, a atividade antitumoral do composto sal de isotiourônio MF08 foi avaliada.

Como visto pelos resultados de medida de área no quarto e sétimo dia, a exposição a 9 μM , 17,5 μM e 35 μM do composto foi capaz de impedir o crescimento das melanoesferas em 15 %, 59 % e 70 %, respectivamente. Estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o SI-MF08, considerando um grupo de 28 moléculas, destacou-se pela atividade citotóxica com concentração necessária de 35 μM para inibir o crescimento de 50 % das células em cultura em monocamada de B16F10 (CC_{50} 35 μM) em 24 horas, além de induzir bloqueio de ciclo celular em G2/M em concentrações inferiores à CC_{50} , além de induzir fragmentação de DNA (ASSUNÇÃO, 2017; FERREIRA et al., 2017).

Portanto, a inibição de crescimento encontrada em melanoesferas expostas a 9 μM , 17,5 μM de SI-MF08 (1/4 da IC_{50} e 1/2 da CC_{50} , respectivamente), pode ser explicada pelo bloqueio do ciclo celular em G2/M causado pelo composto. Já a exposição a 35 μM do composto causou uma drástica diminuição na viabilidade celular (apenas 8 % de células viáveis). O fato de neste estudo as melanoesferas terem sido expostas ao composto por 72 horas contribuiu para a alta porcentagem de células não-viáveis. Adicionalmente, a estimativa da CC_{50} do SI-MF08 em 72h no modelo de melanoesfera foi aproximadamente 2 \times maior quando comparada com a CC_{50} em modelo de monocamada (dados não mostrados).

Com relação a presença de células CD133 e CD44 positivas, foi possível observar que melanoesferas expostas a 9 μM e a 17,5 μM do composto exibiram uma porcentagem de células CD44 positivas menor (74 %, 73 %, respectivamente) quando comparadas com o controle (83 %). Já, o perfil de células positivas em melanoesferas expostas a 35 μM pareceu

aumentar para ambos marcadores, CD133 e CD44 (96% e 97%, respectivamente). Apesar de o SI-MF08 não causar a eliminação das células CD133 e CD44 positivas, promoveu efeito citotóxico, visto que as melanoesferas apresentaram inibição de crescimento e expressiva diminuição da viabilidade celular. Resultados importantes levando em consideração a associação entre a presença de marcadores de CTT e quimioresistência. Além disso, a alta porcentagem de células CD133 e CD44 positivas pode ser relacionada ao próprio modelo estudado, que visa justamente o enriquecimento desta população de células. Estudos adicionais devem ser realizados para a caracterização do potencial tumorigênico das melanoesferas resultantes após a exposição ao SI-MF08.

Em paralelo aos estudos envolvendo modelo tridimensional com linhagem imortalizada de melanoma murino B16F10, foi iniciado também estudo de formação de melanoesfera a partir de tecido tumoral (cultura primária) congelado de camundongos C57BL/6J/Unib injetados com células de melanoma B16F10. Modelos de cultura primária apresentam vantagens, pois assemelham-se ao tecido de origem, reproduzindo sua heterogeneidade além de evitarem possíveis variações fenotípicas que podem ocorrer com o uso de células imortalizadas (PAN et al., 2009; WELTE et al., 2013).

Neste estudo, o estabelecimento de cultura primária a partir de tecido congelado ocorreu após 24 dias de cultivo como observado na Figura 16 e as células apresentaram morfologia celular semelhante à B16F10. O processo de criopreservação mostrou-se efetivo e não prejudicou o estabelecimento da cultura. Mullins e colaboradores (2013) demonstraram em um estudo detalhado que o cultivo primário de células de glioblastoma não sofreu diferenças moleculares ou fenotípicas relevantes entre culturas derivadas de tecido fresco e congelados. O mesmo foi encontrado em linhagens de tumores gastrointestinais (LINNEBACHER et al., 2010; SORIO et al., 2001).

Assim, como visto para a linhagem de B16F10, foi possível a formação de melanoesferas a partir de cultura primária com alta viabilidade celular, grande número de células totais por esferoide e presença de células CD133 e CD44 positivas. Desse modo, a formação de melanoesferas a partir de

cultura primária, abre novas perspectivas para aprimoramento do modelo. Embora, análises adicionais sejam necessárias para validar a presença de células positivas para CD133 e CD44 e caracterizar a tumorigenicidade *in vivo*, as células demonstraram alta taxa de proliferação e viabilidade, que entre outras características, mimetiza o microambiente tumoral. Além disso, o composto estudado mostrou citotoxicidade frente a população CD133 e CD44-positivas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, que se resumem em:

- Desenvolvimento de um modelo de melanoesfera de B16F10 a partir de baixa densidade celular (<1 célula/ μL) e revestimento com gel de agarose 2 %;
- Caracterização de que o volume de gel de agarose utilizado influencia na formação das melanoesferas;
- Definição da melhor condição para a formação de melanoesferas foi com 30 μL de gel de agarose 2 %, pois proporcionou esferoides com alta viabilidade celular, maior tamanho e número de células totais;
- Constatação de que o modelo tridimensional proposto foi capaz de enriquecer a população de células CD133 e CD44 positivas quando comparado com modelo em monocamada;
- Caracterização da ação do SI-MF08, o qual não diminuiu a porcentagem de células que expressam de CD133 e CD44, porém foi capaz de impedir o crescimento das melanoesferas e diminuir a porcentagem de células viáveis;
- Obtenção do cultivo de cultura primária de B16F10 a partir de tecido tumoral criopreservado;
- Formação de melanoesferas com alta viabilidade celular a partir de cultura primária de B16F10 em 30 μL de gel de agarose 2 %.

conclui-se que o conjunto de resultados demonstra que o modelo proposto apresenta vantagens em relação aos modelos 2D, uma vez que se acrescenta interações entre os componentes tumorais, sendo adequado para estudos sobre a biologia do tumor e para *screening in vitro* de novas moléculas antitumorais.

8 PESPECTIVAS

Como perspectivas tem-se:

- Realizar ensaio clonogênico com as melanosferas após tratamento com SI-MF08;
- Quantificar *in vitro*, por citometria de fluxo, a expressão dos marcadores de superfície CD133 e CD44 em melanosferas obtidas a partir de cultura primária de melanoma induzido em camundongos C57BL/6J/Unib;
- Avaliar *in vitro* o padrão de expressão dos marcadores de superfície CD133 e CD44 em melanosferas obtidas a partir de cultura primária após exposição ao sal de isotiurônio MF08.

REFERENCIAS

- AHRENS, T. et al. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 1, p. 93–101, 2001.
- AKBARI-BIRGANI, S. et al. Cancer stem cells, cancer-initiating cells and methods for their detection. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 836–842, 2016.
- ANDOR, N. et al. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. **Nature Medicine**, v. 22, n. 1, p. 105–113, 30 jan. 2016.
- ARRANGOIZ, R. et al. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2016.
- ASSUNÇÃO, L. S. Estudo pré-clínico da atividade antitumoral do sal de isotiourônio MF08 em modelo de melanoma murino. **Tese (Doutorado em Farmácia)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2017
- AUBELE, M. et al. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 110, n. 2, p. 94–102, 15 abr. 1999.
- BADAWI, A. M.; AZZAM, E. M. S.; MORSY, S. M. I. Surface and biocidal activity of some synthesized metallo azobenzene isothiuronium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8661–8665, 2006.
- BECK, B.; BLANPAIN, C. Unravelling cancer stem cell potential. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 727–738, 2013.
- BIELECKA, Z. F. et al. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. **Biological Reviews**, ago. 2016.

BOIKO, A. D. et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. **Nature**, v. 466, n. 7302, p. 133–137, 2010.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–7, jul. 1997.

CALVET, C. Y.; ANDRÉ, F. M.; MIR, L. M. The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

CHAICHANA, K. et al. Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies. **Stem Cells**, v. 24, n. 12, p. 2851–2857, 2006.

CHAIDEMENOS, G. et al. Prevention of malignant melanoma. **Hippokratia**, v. 12, n. 1, p. 17–21, jan. 2008.

CHANG, L. et al. Acquisition of epithelialmesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 10, 2013.

CHIAPPETTA, C. et al. BRAF and NRAS Mutations are Heterogeneous and Not Mutually Exclusive in Nodular Melanoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 23, n. 3, p. 172–177, mar. 2015.

CISILOTTO, J. et al. Isothiuronium salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 15, n. 3, p. 353–62, 2015.

COHEN, S. et al. Synthesis and characterization of crosslinked polyisothiuronium methylstyrene nanoparticles of narrow size distribution for antibacterial and antibiofilm applications. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 56, 7 dez. 2016.

COLLINS, A. T. et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 10946–10951, 2005.

COLOMBINO, M. et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 20, p. 2522–9, 10 jul. 2012.

COONS, S. W.; JOHNSON, P. C.; SHAPIRO, J. R. Cytogenetic and flow cytometry DNA analysis of regional heterogeneity in a low grade human glioma. **Cancer research**, v. 55, n. 7, p. 1569–77, 1 abr. 1995.

DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. **Stem Cells**, v. 112, n. 13, p. 4793–4807, 2008.

DONNENBERG, V. S.; DONNENBERG, A. D. Multiple drug resistance in cancer revisited: The cancer stem cell hypothesis. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 8, p. 872–877, 2005.

DUAN, J.-J. et al. Strategies for isolating and enriching cancer stem cells: well begun is half done. **Stem cells and development**, v. 22, n. 16, p. 2221–39, 2013.

ERAMO, A. et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 3, p. 504–514, 2008.

FEDER-MENGUS, C. et al. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 8, p. 333–340, 2008.

FERREIRA, M. et al. Allylic isothiuronium salts: The discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, 2017.

FRANK, N. Y.; SCHATTON, T.; FRANK, M. H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 1, p. 41–50, 2010.

GOGAS, H. J.; KIRKWOOD, J. M.; SONDAK, V. K. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? **Cancer**, v. 109, n. 3, p. 455–64, fev. 2007.

GORDON, R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160–169, 2013.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

GREINERT, R. Skin Cancer: New Markers for Better Prevention. **Pathobiology**, v. 76, n. 2, p. 64–81, 2009.

GRZYWA, T. M.; PASKAL, W.; WŁODARSKI, P. K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. **Translational Oncology**, v. 10, n. 6, p. 956–975, 2017.

INCA. **INCA- Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso: 10 fevereiro. 2018

KELM, J. M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 2, p. 173–180, 2003.

KLEIN, C. A. et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. **The Lancet**, v. 360, n. 9334, p. 683–689, 31 ago. 2002.

KORONKIEWICZ, M. et al. Proapoptotic effects of new pentabromobenzylisothiuronium salts in a human prostate adenocarcinoma cell line. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 69, n. 6, p. 1325–33, 2012.

KORONKIEWICZ, M. et al. New benzimidazole-derived isothiureas as potential antileukemic agents--studies in vitro. **Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))**, v. 11, n. 4, p. 364–72, 2015.

KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 275–291, 2014.

KUMAR, D. et al. Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133+ Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 12, p. 2462–2474, 2016.

LAPIDOT, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645–648, 1994.

LE PENNEC, S. et al. Intratumor heterogeneity and clonal evolution in an aggressive papillary thyroid cancer and matched metastases. **Endocrine Related Cancer**, v. 22, n. 2, p. 205–216, 19 mar. 2015.

LINNEBACHER, M. et al. Cryopreservation of human colorectal carcinomas prior to xenografting. **BMC Cancer**, v. 10, p. 362, 2010.

MANI, S. A. et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704–715, 2008.

MAROTTA, L. L. C.; POLYAK, K. Cancer stem cells: a model in the making. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 19, n. 1, p. 44–50, 2009.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323–34, 2012.

MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: Causes and consequences. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1805, n. 1, p. 105–117, 2010.

MAVERAKIS, E. et al. Metastatic melanoma – A review of current and future treatment options. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 5, p. 516–524, 2015.

MIN, S. O. et al. Ideal sphere-forming culture conditions to maintain pluripotency in a hepatocellular carcinoma cell lines. **Cancer cell international**, v. 15, n. 1, p. 95, 2015.

MITRUS, I. et al. Properties of B16-F10 murine melanoma cells subjected to metabolic stress conditions. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 3, p. 363–366, 2012.

MORENO, M.; CONTE, B.; MENEGAT, E. Diferenças Clínico-Epidemiológicas entre Pacientes Masculinos e Femininos com Diagnóstico de Melanoma Cutâneo no Oeste de Santa Catarina Clinical-Epidemiological Differences Between Male and Female Patients Diferencias Clínicas y Epidemiológicas entre Pac. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 61, n. 1, p. 15–21, 2015.

OHNISHI, K. et al. Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroids. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 2, p. 581–586, 2014.

OMHOLT, K. et al. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 17, p. 6483–8, 15 dez. 2003.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current protocols in immunology**, s. 39, p. 20.1.1-20.1.29, 2000.

PAN, C. et al. Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 3, p. 443–450, 2009.

PONTI, D. et al. Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem / Progenitor Cell Properties. n. 13, p. 5506–5512, 2005.

PRASETYANTI, P. R.; MEDEMA, J. P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 41, 2017.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. **Science**, v. 255, n. 5052, p. 1707–1710, 1992.

RICCI-VITIANI, L. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 111–115, 2007.

RIETSCHER, P. et al. Phase II Study of Extended-Dose Temozolomide in Patients With Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 14, p. 2299–2304, maio 2008.

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.

SALAMA, M. A. et al. Original Research Article S-Benzyl Isothiouonium salts of some Sulfonylureas as potential herbicides. v. 4, n. 12, p. 337–342, 2015.

SALEH, N. A. Cultura Celular Tridimensional: Desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais. **Dissertação (Mestrado em Farmácia)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 112 páginas, 2017.

SCHATTON, T.; FRANK, M. H. Cancer stem cells and human malignant melanoma. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 1, p. 39–55, 2008.

SCHEEL, C.; WEINBERG, R. A. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 5–6, p. 396–403, out. 2012.

SHEILA K. SINGH, IAN D. CLARKE, MIZUHIKO TERASAKI, VICTORIA E. BONN, CYNTHIA HAWKINS, JEREMY SQUIRE, A.; DIRKS, P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Res**, v. 63, p. 5821–5828, 2003.

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.

SINGEC, I. et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. **Nature Methods**, v. 3, n. 10, p. 801–806, 2006.

SORIO, C. et al. Successful xenografting of cryopreserved primary pancreatic cancers. **Virchows Archiv**, v. 438, n. 2, p. 154–158, 2001.

SZTILLER-SIKORSKA, M. et al. Sphere formation and self-renewal capacity of melanoma cells is affected by the microenvironment. **Melanoma Research**, v. 22, n. APRIL, p. 215–224, 2012.

TAIT, A. et al. S-Aryl(tetramethyl)isothiuronium salts as possible antimicrobial agents--III. **II Farmaco; edizione scientifica**, v. 43, n. 12, p. 979–88, dez. 1988.

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 131–142, 1 fev. 2006.

TÍMÁR, J. et al. **Cancer Genomics: Molecular Classification, Prognosis and Response Prediction**. [s.l.] Springer Netherlands, 2013.

TRANI, A. et al. Thioureas and isothiuronium salts of the aglycone of teicoplanin. **J. Antibiot.**, v. 62, p. 1268–1275, 1989.

TURKSEN, K. **Stem Cell Biology and Regenerative Medicine**. [s.l.] Humana Press, 2013.

VENKATACHALAM, T. . et al. Substituted heterocyclic thiourea compounds as a new class of anti-allergic agents inhibiting IgE/FcεRI receptor mediated mast cell leukotriene release. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 1095–1105, 2003.

VENKATACHALAM, T. .; MAO, C.; UCKUN, F. . Effect of stereochemistry on the anti-HIV activity of chiral thiourea compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 15, p. 4275–4284, 2004.

VENKATARAMAN, G. et al. Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 845–50, 23 jan. 1996.

VERMEULEN, L. et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 468–476, 25 maio 2010.

VERMEULEN, L. et al. The developing cancer stem-cell model: Clinical challenges and opportunities. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 2, p. e83–e89, 2012.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 10, p. 755–68, 2008.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.

WELTE, Y. et al. Patient derived cell culture and isolation of CD133⁺ putative cancer stem cells from melanoma. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 73, p. e50200, 2013.

WHITEMAN, D. C.; PAVAN, W. J.; BASTIAN, B. C. The melanomas: A synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 24, n. 5, p. 879–897, 2011.

WHO. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

YANG, M.-H.; IMRALI, A.; HEESCHEN, C. Circulating cancer stem cells: the importance to select. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 27, n. 5, p. 437–49, 2015.

ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–11, 2016.

APÊNDICE A. Parecer do comitê de ética no uso de animais

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00892

Título

Avaliação das propriedades antitumorais e antiadipogênicas de compostos sintéticos, semissintéticos e nanoestruturados: estudos agudos e subagudos

Data de Entrada

17/10/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/11/2013

Considerações

Ofício nº 121/CEUA/PROPEAQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Beatriz Creczynki Pasa, Departamento de Farmácia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de um mil e seiscentos camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC e laboratórios de modelos biológicos.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

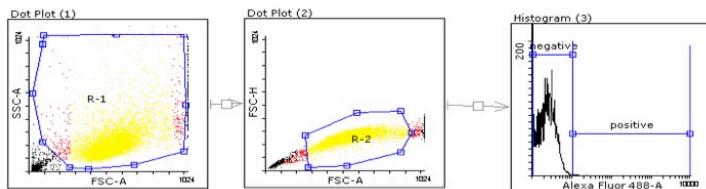
Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 13/02/2018**

Data 13/11/2013

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

APÊNDICE B. Perfil padrão dos *dot plots* e histograma utilizados.



Perfil padrão dos *dot plots* e histograma representativos da análise por citometria de fluxo.