



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO - CTC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MAÍRA DE ANDRADE PEIXOTO

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MELANOMA 3D PARA
SCREENING DE DROGAS ANTICÂNCER IN VITRO**

FLORIANÓPOLIS

2019

Maíra de Andrade Peixoto

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MELANOMA 3D PARA *SCREENING* DE
DROGAS ANTICÂNCER**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Florianópolis

2019

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

Peixoto, Maíra de Andrade

Desenvolvimento de modelo de melanoma 3D para screening
de drogas anticâncer in vitro / Maíra de Andrade Peixoto ;
orientador, Luismar Marques Porto, 2019.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Nanocelulose bacteriana. 3.
Esferoides tumorais. 4. Melanoma. 5. Screening de drogas
anticâncer. I. Porto, Luismar Marques. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. III. Título.

Maíra de Andrade Peixoto

Desenvolvimento de Modelo de Melanoma 3D para *Screening* de Drogas Anticâncer

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

Prof. Edroaldo Lummertz da Rocha, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Fernanda Vieira Berti, Dr^a.
Biocelltis Biotecnologia S.A.

Guilherme Colla, Dr.
Biocelltis Biotecnologia S.A.

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

Prof. Dr^a. Cíntia Soares
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Florianópolis, 16 de dezembro de 2019.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Rosani e Mauro, e a todos que, no momento, enfrentam um câncer de pele melanoma.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, por proporcionar ensino de qualidade e gratuito. O Pós ENQ-UFSC fará para sempre parte da minha história.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Luismar Marques Porto, pela orientação e oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa.

À Emily Marques dos Reis, pela amizade construída desde a graduação, pela coorientação, pelos ensinamentos compartilhados, com quem aprendi muito, pelo apoio em todos os momentos e por acreditar em mim, até mesmo quando eu não acreditava. Tua amizade foi fundamental nesse processo.

À Karina Cesca, pelos ensinamentos, pelo auxílio nas análises realizadas nesse trabalho e pelo carinho. Obrigada, por estar sempre disponível em me ajudar!

A todo o grupo do antigo Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab), em especial ao Guilherme Colla, por compartilhar sua experiência e esclarecer dúvidas.

A todos os alunos de iniciação científica do laboratório, que me auxiliaram de forma direta ou indiretamente: Vinicius Heidemann, Ana Carolina Meyer, Veronica Voltolini, Willian Trentin e Tassiane Astuti. Um agradecimento especial à Michelli Buratto, pela ajuda sempre que necessária nos experimentos e por ser minha IC favorita.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), pelas análises de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC), pelas análises realizadas.

A Central de Análises, pela realização da análise de caracterização.

À minha família, meu irmão Maurinho, meu tio Albérico, em especial a minha vó Iracy, pela torcida, orações e carinho.

Aos meus amigos, pelas conversas, pelos momentos de descontração, pelas risadas e por estarem sempre do meu lado, me incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao “AMIGO NUDES”, minha família de fora. Obrigada pelo carinho, incentivo, pelas palavras de conforto e conselhos, mesmo via WhatsApp, a presença de vocês é diária e alegra muito meus dias. Carrego vocês no meu coração!

Às minhas “MANAS”, minhas amigas de uma vida inteira, obrigada pela torcida, de longe ou perto, sempre estiveram comigo ao longo deste e outros períodos de minha vida.

Ao Sadi, pelo apoio durante todo esse processo, por acreditar em mim, por me incentivar a sempre dar o meu melhor, por ser meu ombro em inúmeros momentos que precisei, por estar ao meu lado, pela compreensão quando não pude estar presente, pelo cuidado, carinho, amor e amizade. Obrigada!

Aos meus pais, Mauro e Rosani, pelo amor, apoio, incentivo e carinho. Por compreenderem minha ausência em algumas ocasiões especiais, pela preocupação e cuidado. Enfim, sem eles nada seria possível, obrigada por tanto! Amo vocês!

A todos que contribuíram, torceram e acreditaram nesse trabalho. Obrigada!

Quando acreditamos apaixonadamente em algo que ainda não existe, nós o criamos. O inexistente é o que não desejamos o suficiente. (Franz Kafka)

RESUMO

O melanoma é o câncer de pele mais grave, pois apresenta alto índice de mortalidade, sendo responsável por 80% das mortes decorrentes de câncer de pele. Isso se deve ao seu comportamento invasivo que leva ao desenvolvimento de metástase. Na metástase, o tumor é capaz de crescer e invadir os tecidos adjacentes chegando à corrente sanguínea e se alastrando em tecidos mais afastados do tumor primário. Atualmente há inúmeros estudos para mimetizar o comportamento tumoral *in vivo*, usando principalmente esferoides tumorais, visando aperfeiçoar modelos *in vitro* para compreensão de processos mais complexos, como a invasão tumoral e angiogênese. A fim de auxiliar nesse processo, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma tumoral 3D de modelo de melanoma para *screening* de drogas anticâncer. Para isso, o colágeno do tipo I (COL) foi imobilizado através de ligações covalentes na estrutura dos hidrogéis de nanocelulose bacteriana (BNC) formando o hidrogel BNC-COL. A imobilização foi confirmada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier. A presença de colágeno influenciou diretamente no comportamento celular apresentado pelas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) e esferoides de células de melanoma humano (SK-MEL-28) que foi diferenciado do hidrogel de BNC puro. A superfície inferior do hidrogel BNC-COL foi a que apresentou os melhores resultados para ambas as células. As células de SK-MEL-28 mostraram-se capazes de formarem esferoides. Os esferoides foram formados e caracterizados em três tempos distintos, sendo o segundo dia de formação o empregado no modelo 3D. As HUVECs e os esferoides de SK-MEL-28 foram cocultivados em três condições diferentes. A primeira condição consiste em inocular na BNC-COL as duas linhagens ao mesmo tempo. Na segunda condição cultiva-se primeiramente as HUVECs e após 24 h os esferoides de SK-MEL-28 e na terceira condição ocorre o contrário, primeiro são cultivados os esferoides de SK-MEL-28 e após 24 h as HUVECs. As condições de cocultivo foram avaliadas por diferentes técnicas de microscopia. A condição 2 foi a escolhida para ser usada no modelo 3D. Após, o cocultivo foi acompanhado por 7 dias, sendo os dias 1, 3 e 7 analisados. O sétimo dia mostrou a maior área de invasão quantificada pelo *software* Wimasis e por isso utilizado no modelo 3D. O modelo 3D proposto por esse trabalho obteve um resultado positivo quando em contato com a doxorrubicina (DOX), sendo mais resistente a DOX em comparação com os modelos 2D e esferoides 3D. Logo, a plataforma desenvolvida nesse trabalho mostrou-se promissora para o emprego em *screening* de drogas anticâncer.

Palavras-chave: Nanocelulose bacteriana. Esferoides tumorais. Melanoma. SK-MEL-28. modelos 3D. *Screening* de drogas. Doxorrubicina.

ABSTRACT

Melanoma is the most serious skin cancer because it has a high mortality rate, accounting for 80% of deaths from skin cancer. This is due to their invasive behaviour that leads to the development of metastasis. In metastasis, the tumor can grow and invade adjacent tissues reaching the bloodstream and spreading to tissues farther from the primary tumor. There are currently numerous studies to mimic tumor behavior in vivo, mainly using tumor spheroids, aiming to improve in vitro models to understand more complex processes such as tumor invasion and angiogenesis. In order to assist in this process, the present work aims to develop a 3D tumor platform of melanoma model for anticancer drug screening. For this, type I collagen (COL) was immobilized through covalent bonds in the structure of bacterial nanocellulose hydrogels (BNC) forming the hydrogel BNC-COL. Immobilization was confirmed by FTIR spectroscopy. The presence of collagen directly influenced the cellular behaviour of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human melanoma cell spheroids (SK-MEL-28), which was differentiated from pure BNC hydrogel. The bottom surface of the BNC-COL hydrogel showed the best results for both cells. SK-MEL-28 cells were able to form spheroids. The spheroids were formed and characterized in three distinct times, being the second day of formation the employee in the 3D model. HUVECs and SK-MEL-28 spheroids were co-cultured under three different conditions. The first condition is to inoculate on BNC-COL both cell lines at the same time. In the second condition the HUVECs were first cultured and after 24 h the SK-MEL-28 spheroids were cultivated and in the third condition the opposite happens, first the SK-MEL-28 spheroids were cultivated and after 24 h the HUVECs. Co-cultivation conditions were evaluated by different microscopy techniques. Second condition was chosen to be used in the 3D model. The co-cultivation was evaluated in first, third and seventh day. The seventh day showed the largest invasion area quantified by Wimasis software and therefore used in the 3D model. The 3D model proposed in this work obtained excellent results when in contact with doxorubicin (DOX), being more resistant to DOX compared to 2D models and 3D spheroids. Therefore, the platform developed in this study proved to be suitable for use in anticancer drug screening.

Keywords: Bacterial nanocellulose. Tumor spheroids. Melanoma. SK-MEL-28. 3D models. Drug Screening. Doxorubicin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Migração celular dirigida de células tumorais.....	22
Figura 2 - Microambiente Tumoral.	23
Figura 3 - Comparação entre os modelos 2D e 3D.....	30
Figura 4 - Estrutura de um esferoide multicelular tumoral.	33
Figura 5 - Estrutura molecular da BNC (n= graus de polimerização).....	35
Figura 6 - A contribuição do colágeno para as células cancerígenas.	38
Figura 7 - Fluxograma geral das metodologias empregadas neste trabalho.....	41
Figura 8 - Processo de Produção de membranas de BNC.	43
Figura 9 - Imobilização do Colágeno tipo I na BNC.....	45
Figura 10 - Produção do molde de agarose e de esferoides de SK-MEL-28.....	48
Figura 11- Espectroscopia FTIR das membranas de BNC e BNC-COL.	53
Figura 12 - Micrografias da BNC e BNC-COL.	54
Figura 13 - Concentração de colágeno na solução inicial e final. Resultados expressos em mg/mL (média ± desvio padrão, n=3).	56
Figura 14 - Morfologia dos esferoides nos três tempos de formação em microscopia de campo claro.	57
Figura 15 – Ensaio de Live/Dead nos esferoides nos três tempos de formação.....	59
Figura 16 – Atividade metabólica no primeiro, segundo e terceiro dia de formação do esferoides, através do método de MTS. Resultados expressos como média ± desvio padrão.	60
Figura 17 - Cultivo de HUVECs em meio de cultivo RPMI durante 3 dias nas superfícies superiores e inferiores da BNC e BNC-COL.	61
Figura 18 - Cultivo de esferoides de SK-MEL-28 em meio de cultivo DMEM durante 3 dias nas superfícies superiores e inferiores da BNC e BNC-COL.....	63
Figura 19 - Cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 na superfície inferior da BNC-COL.....	65
Figura 20 - Micrografias do cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 no terceiro dia de cocultivo.....	67
Figura 21 - Imagens em campo claro dos esferoides na condição 1 (HUVECs + esferoides de SK-MEL-28), na condição 2 (HUVECs e após 24 h adição de esferoides de SK-MEL-28) e na	

condição 3 (esferoides de SK-MEL-28 e após 24 h adição de HUVECs) de cocultivo na superfície inferior da BNC-COL analisadas pelo <i>software</i> Wimasis. Barra de escala representando 200 μm	68
Figura 22 - Imagens em campo claro do cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 na superfície inferior da BNC-COL nos dias 1, 3 e 7. Barras de escala representando 200 μm	70
Figura 23 – Imagens de microscopia confocal do cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 na superfície inferior da BNC-COL nos dias 1, 3 e 7. As células foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e DAPI (azul). Barras de escala representando 200 μm	70
Figura 24 – Migração celular a partir dos esferoides no sétimo dia de cocultivo.	71
Figura 25 - Imagens em campo claro de esferoides nos dias 1, 3 e 7 no cocultivo com HUVECs em superfície inferior da BNC-COL analisadas pelo <i>software</i> Wimasis. Barra de escala representando 200 μm	72
Figura 26 - Atividade metabólica do modelo de monocamada 2D, modelo esferoide 3D e modelo de melanoma 3D quando em contato com as diferentes concentrações molares da DOX por 24 h, através do método de MTS. Valores expressos em média \pm desvio padrão, n=5.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados quantitativos da área do esferoide e invasão nas três condições de cocultivo em pixels (px).	69
Tabela 2 - Resultados quantitativos da área do esferoide e de invasão nos dias 1, 3 e 7 em pixels (px).	72
Tabela 3 - Resultados quantitativos da atividade metabólica do modelo de monocamada 2D, modelo esferoide 3D e modelo de melanoma 3D em diferentes concentrações molares de DOX.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D: bidimensional

3D: tridimensional

BNC: nanocelulose bacteriana

BNC-COL: colágeno imobilizado em nanocelulose bacteriana

DAPI: (4'-6'-diamidino-2-fenilindol)

DO: densidade óptica

DOX: doxorrubicina

EDC: (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida)

FTIR: Infravermelho com Transformada de Fourier

HUVECs: células endoteliais de veia humana umbilical

MCTS: esferoides tumorais multicelulares

MEC: matriz extracelular

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MMPs: metaloproteinases de matriz

MTS: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]

PBS: tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

pH: potencial hidrogeniônico

SK-MEL-28: células de melanoma humano

UV: radiação ultravioleta

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1.1	Objetivo Geral	18
2.1.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	CÂNCER	19
3.1.1	Câncer de pele	20
3.1.1.1	Melanoma	20
3.1.2	Invasão Tumoral	21
3.1.3	Microambiente Tumoral	23
3.1.4	Angiogênese Tumoral	25
3.2	SELEÇÃO DE FÁRMACOS ANTICÂNCER	27
3.3	CULTURA CELULAR 2D <i>VERSUS</i> 3D	28
3.3.1	Esferoides	31
3.4	HIDROGÉIS	34
3.4.1	Nanocelulose Bacteriana (BNC)	35
3.5	COLÁGENO	36
3.6	DOXORRUBICINA	38
4	MATERIAS E MÉTODOS	40
4.1	PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA	41
4.1.1	Linhagem, meio e condições de cultura bacteriana	41
4.1.2	Reativação da cepa e produção da placa de trabalho e/ou manutenção	42
4.1.3	Produção do pré-inóculo, inóculo e membranas de BNC	42
4.1.4	Purificação das membranas de BNC	43
4.2	FUNCIONALIZAÇÃO DA BNC	43
4.2.1	Imobilização de Colágeno I (COL)	43

4.3	CARACTERIZAÇÃO DA BNC-COL	45
4.3.1	Caracterização Química da BNC-COL.....	45
4.3.2	Quantificação de colágeno imobilizado na BNC por Sirius red.....	45
4.3.3	Caracterização microestrutural da BNC- COL	46
4.4	ENSAIOS IN VITRO.....	46
4.4.1	Cultura de Células.....	46
4.4.2	Esferoides de SK-MEL-28	47
4.4.2.1	Esterilização dos moldes	47
4.4.2.2	Preparo da Agarose 2% em Salina 0,9% NaCl	47
4.4.2.3	Preparo do molde de agarose.....	47
4.4.2.4	Produção dos esferoides	48
4.4.2.5	Remoção dos esferoides	48
4.4.2.6	Viabilidade Celular dos Esferoides	49
4.4.2.6.1	<i>Live/Dead</i>	<i>49</i>
4.4.2.7	Morfologia dos esferoides	49
4.4.2.7.1	<i>Microscopia em campo claro</i>	<i>49</i>
4.4.3	Cultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 nas superfícies da BNC e BNC-COL.....	49
4.4.4	Cocultivo de HUVEC e esferoides de SK-MEL-28 em BNC-COL lado inferior	50
4.4.5	Ensaio de Invasão de Esferoides Tumorais.....	51
4.4.6	Avaliação da atividade citotóxica da DOX em diferentes modelos de culturas celulares: SK-MEL-28 (2D), esferoides de SK-MEL-28 (3D) e cocultivo de esferoides de SK-MEL-28 e HUVECs em BNC-COL (3D)	51
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BNC	53
5.1.1	Quantificação de colágeno imobilizado na BNC por Sirius red.....	55
5.2	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ESFEROIDES	57

5.3	CULTIVO DE HUVECS E ESFEROIDES DE SK-MEL-28 NAS SUPERFÍCIES DA BNC E BNC-COL	60
5.4	COCULTIVO DE HUVEC E ESFEROIDES DE SK-MEL-28 EM SUPERFÍCIE INFERIOR DA BNC-COL	64
5.5	INVASÃO TUMORAL EM DIFERENTES TEMPOS DE COCULTIVO (HUVECS + ESFEROIDES DE SK-MEL-28)	69
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA DOX EM DIFERENTES MODELOS DE CULTURAS CELULARES: SK-MEL-28 (2D), ESFEROIDES DE SK-MEL-28 (3D) E COCULTIVO DE ESFEROIDES DE SK-MEL-28 E HUVECS EM BNC-COL (3D).....	73
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A – Curva padrão de quantificação de colágeno por <i>Sirius red.</i>	91

1 INTRODUÇÃO

Melanoma é a forma mais grave de câncer de pele devido ao seu comportamento agressivo. É caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado das células produtoras de melanina, os melanócitos (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018a; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2017). O melanoma pode ocorrer em qualquer parte da pele ou mucosas e aparece na forma de manchas, pintas ou sinais (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018b). Só no Brasil são estimados mais de 6.260 novos casos de melanoma, sendo 53% em mulheres (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018a). O melanoma é a forma mais letal de câncer de pele e sua incidência segue aumentando a cada ano, sendo hoje responsável por mais de 80% das mortes por câncer de pele (KLICKS et al., 2019). A mortalidade do melanoma está diretamente ligada à sua grande capacidade de desenvolver metástase (HERRAIZ et al., 2017).

A metástase é caracterizada pelo crescimento dos tumores e invasão dos tecidos adjacentes através da formação de vasos sanguíneos, denominado angiogênese (FOLKMAN, 1971). A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos preexistentes e é um dos processos fundamentais para o desenvolvimento do tumor, pois, o tumor envia sinais químicos, estimulando assim, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, que chegam até ele transportando o sangue (nutrientes e oxigênio) (PINHO, 2005).

Para o estabelecimento da metástase e outros processos há inúmeros sinais microambientais envolvidos. O microambiente das células de melanoma envolve fibroblastos, queratinócitos (estágio inicial), células endoteliais e células do sistema imunológico, que fornecem um rico repertório de moléculas secretadas (HERRAIZ et al., 2017).

Ao longo dos últimos anos, há inúmeras pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novas drogas com atividade antitumoral (LANGHANS, 2018; LOPES, 2018; SALEH, 2017). Anteriormente essas pesquisas utilizavam modelos 2D, porém eles falham em recapitular a complexidade dos microambientes tumorais, pois carecem de interações intercelulares complexas e da maioria das vias celulares. Já o crescimento de células cancerígenas em estruturas 3D são considerados modelos mais rigorosos e representativos para realizar triagem de drogas anticâncer in vitro (ZANONI et al., 2019). Por isso, os trabalhos atuais permitiram

uma maior compreensão do comportamento das células tumorais, principalmente nos cultivos celulares 3D, onde o tumor é simulado pela utilização de esferoides.

Esferoides são agregados celulares esféricos 3D. O seu formato é especialmente útil na pesquisa de câncer, pois os esferoides apresentam comportamentos celulares diferentes daqueles conhecidos em culturas de monocamadas. Os modelos tridimensionais de esferoides tumorais multicelulares (MCTS) se assemelham mais aos tumores sólidos *in vivo* e dessa forma fornecem ferramentas valiosas para a identificação *in vitro* de possíveis alvos farmacológicos antineoplásicos (ZANONI et al., 2019). Os MCTS são um dos modelos 3D *in vitro* mais extensamente utilizado em pesquisas pré-clínicas de oncologia e tem apresentado resultados promissores em relação a eficácia *in vivo* de vários agentes quimioterápicos (ANTONI et al., 2015; GONG et al., 2015; HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016; HSIAO; YOUNG, 2018; LAZZARI et al., 2018; SONG; PARK; GERECHT, 2014).

Modelos mais complexos estão sendo desenvolvidos, como por exemplo modelos que cultivam os MCTS em *scaffolds* 3D. Esses modelos replicam melhor o microambiente tumoral existente em tumores *in vivo*, pois facilitam as interações fisiológicas celulares, o crescimento e a invasão tumoral (TEVIS; COLSON; GRINSTAFF, 2017).

Um modelo mais robusto pode ser obtido com o uso de hidrogéis sintéticos (BERENS et al., 2015; VINCI; BOX; ECCLES, 2015). Os *scaffolds* de hidrogéis biomiméticos oferecem pistas biofísicas e bioquímicas que auxiliam a recapitular o comportamento da MEC, essencial para a regulação do comportamento das células cancerígenas (LI; KUMACHEVA, 2018). Os hidrogéis favorecem também as interações célula-célula e/ou célula-MEC (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; MILLER et al., 2010).

A nanocelulose bacteriana (BNC) pertence aos hidrogéis que se assemelham estruturalmente a MEC nativa e é secretada por bactérias do gênero *Komagataeibacter* com estrutura de nanofibras hidrofílicas (RAMBO et al., 2008). A composição da BNC é predominada por monômeros de glicose com ligações β (1–4) glicosídicas, sendo $(C_6H_{10}O_5)_n$ sua fórmula química (PARK; PARK; JUNG, 2003). Graças a sua estrutura, a BNC possui propriedades físico-químicas importantes, como a capacidade de retenção de água, porosidade, biocompatibilidade e resistência mecânica (KLEMM et al., 2011).

A semelhança do hidrogel de BNC com a MEC nativa juntamente com a incorporação de moléculas bioativas como o colágeno, configura um ambiente 3D apropriado para suportar a adesão, proliferação, diferenciação e migração (KARAMYSHEVA, 2008; KLEINMAN; MARTIN, 2005). O colágeno possui alta biocompatibilidade e baixa

imunogenicidade, sendo uma das proteínas mais escolhidas para a preparação de biomateriais. O colágeno é a principal proteína da MEC de tecidos animais, como ossos e pele e compreende 25% do peso seco total dos mamíferos (DRURY; MOONEY, 2003). Há grupos de pesquisas que usam *scaffolds* de colágeno para estudar o comportamento celular, como migração e proliferação (LASCHKE; MENGER, 2017). Há também estudos de câncer com *scaffolds* de colágeno para culturas 3D, a fim de analisar o caráter invasivo das células tumorais e a interação entre células cancerígenas e outros tipos de celulares (VINCI; BOX; ECCLES, 2015; YUAN et al., 2018). Esse ambiente 3D ainda pode ser utilizado para testes de drogas anticancerígenas com foco na ação antiangiogênica (OLIVIERO; VENTRE; NETTI, 2012; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Logo, o presente trabalho visa o desenvolvimento de uma plataforma experimental para testes *in vitro* de fármacos anticâncer. A plataforma consiste no cocultivo de esferoides de células de melanoma (SK-MEL-28) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) em *scaffolds* de BNC funcionalizados com colágeno do tipo I (COL).

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um modelo de melanoma 3D para *screening* de drogas anticâncer in vitro.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Funcionalizar hidrogéis de nanocelulose bacteriana (BNC) através da imobilização química de colágeno I (COL);
- Estabelecer o método de formação de esferoides das células de melanoma humano (SK-MEL-28);
- Analisar o comportamento celular e a morfologia das células de veia endotelial humana (HUVECs) e esferoides de SK-MEL-28 nos hidrogéis BNC e BNC-COL;
- Realizar a cocultura de células HUVECs e esferoides SK-MEL-28 em hidrogéis BNC-COL;
- Analisar o comportamento dos esferoides SK-MEL-28 quanto a invasão nos hidrogéis BNC-COL;
- Avaliar o efeito citotóxico do fármaco doxorrubicina no modelo proposto comparando com modelos já utilizados na literatura como 2D e 3D.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER

Câncer é o crescimento anormal de células, causado por modificações na expressão de genes que levam a desregulação da proliferação e morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células cancerosas se reproduzem de maneira acelerada formando os tumores malignos, que são um acúmulo de células alteradas agressivas e incontroláveis (ARAÚJO, 2016; CARLSON, 2016). As células cancerosas acabam não respondendo aos sinais que controlam o comportamento celular normal e seguem crescendo e se dividindo de maneira descontrolada, invadindo tecidos e órgãos normais e, eventualmente, se espalhando por todo o corpo através dos sistemas circulatório ou linfático, processo denominado de metástase. (COOPER, 2000).

A metástase inicia com as células cancerígenas adquirindo a capacidade de invadir o tecido em volta, rompendo a membrana basal que confina o epitélio. Então, as células tumorais atravessam até os vasos sanguíneos e/ou linfáticos, chegando no lúmen desses vasos (intravasamento) e ao sobreviverem ao transporte através desses vasos saem da vasculatura (extravasamento) e se organizam-se em pequenos aglomerados de células que irão proliferar no microambiente de um novo tecido (COOPER, 2000). Devido a isso esse processo complexo é responsável por mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer (WELCH, 2007; ZHANG et al., 2018a). Para o crescimento do tumor e o desenvolvimento de metástase é de importância fundamental o recrutamento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, por meio da angiogênese. Assim, os tumores acabam requerendo novos vasos através da liberação de fatores e citocinas para suprir suas principais necessidades como nutrientes e oxigênio e por fim essa neovascularização pode ocasionar a metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SZOT et al., 2011; VERBRIDGE; CHANDLER; FISCHBACH, 2010).

Dentre os tipos de cânceres com maior probabilidade de provocar metástase, encontra-se o melanoma, que é a forma mais letal de câncer de pele (KLICKS et al., 2019). No Brasil, o câncer de pele corresponde cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, sendo 3% desses representados pelo melanoma, com estimativa de 6.260 de novos casos (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018a). Sua incidência

umenta todo o ano e já responsável por mais de 80% das mortes por câncer de pele (KLICKS et al., 2019).

3.1.1 Câncer de pele

O câncer de pele surge mais frequentemente na epiderme, como o carcinoma das células basais e o carcinoma das células escamosas da pele, conhecidos como câncer de pele não-melanoma, mas também pode surgir em qualquer estrutura da pele, como nos melanócitos (melanoma), vasos sanguíneos (angiossarcoma), estruturas anexais (tumores malignos das glândulas sudoríparas) e no tecido conjuntivo (dermatofibrossarcoma protuberante). Os mais comuns são o câncer de pele não melanoma e o melanoma, sendo esses dois grupos responsáveis por 95% dos cânceres de pele. Porém, três quartos de todas as mortes relacionadas ao câncer de pele se devem ao melanoma, mostrando que esse é uma forma mais grave de câncer de pele (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; OGDEN; TELFER, 2009; SCHÜZ; EID, 2015).

O risco de desenvolver câncer de pele aparece através da associação de fatores genéticos e ambientais, sendo a causa mais comum a exposição prolongada a luz ultravioleta (UV). A exposição à radiação ultravioleta é considerada o principal fator de causa de todos os tipos de câncer de pele, conseqüentemente a proteção solar é um meio eficaz e essencial para prevenir o envelhecimento prematuro da pele, bem como o câncer de pele em qualquer idade. Estudos sugerem que a exposição solar seja responsável por 99% do total de câncer de pele não melanoma e 95% do total de melanoma. (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; SCHÜZ; EID, 2015).

3.1.1.1 Melanoma

O câncer de pele melanoma é originado nos melanócitos, células produtoras de melanina (substância que dá coloração a pele). É um tipo de câncer muito agressivo e resistente aos tratamentos disponíveis, sendo altamente fatal, graças a sua facilidade em se espalhar e provocar metástase (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018b). O melanoma cutâneo causa 55.000 mortes por ano e suas taxas de incidência e mortalidade são diferentes em todo o mundo, pois depende da detecção precoce e de cuidados primários (DROR et al., 2016; SCHADENDORF et al., 2018; WATSON et al., 2011).

O melanoma inicia em seu estágio primário, onde os melanócitos proliferam pela epiderme basal em direção à epiderme superior, processo conhecido como melanoma *in situ*.

Nos melanomas *in situ* não há metástase. Após o primeiro estágio, as células do melanoma invadem a derme e os componentes mesenquimais. Essa etapa é definitiva para o desenvolvimento da doença, porque há um aumento no contato com os vasos sanguíneos, possibilitando a metástase. Para que ocorra a metástase é necessária uma transição para a fase do melanoma invasivo, caracterizada pela invasão da derme e o aumento da vascularização permitindo que as células de melanoma se espalhem. Os microambientes tumorais, constituídos de vários tipos de células vizinhas nas camadas epidérmica e dérmica, auxiliam os melanócitos a se transformarem de melanoma *in situ* para melanoma invasivo (DROR et al., 2016; GOLAN et al., 2015).

3.1.2 Invasão Tumoral

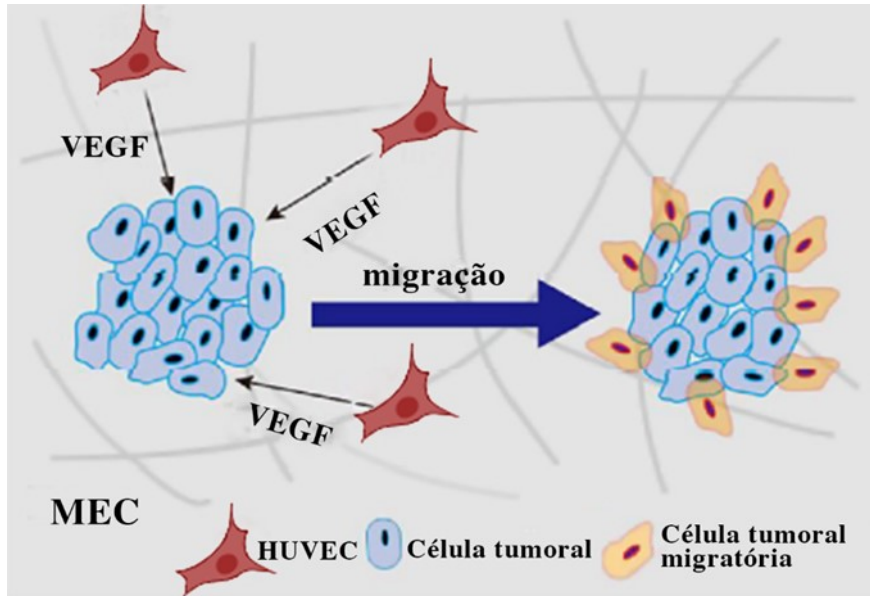
O tumor inicia com um processo de alteração genética que leva à uma proliferação celular anormal de uma única célula. A proliferação desregulada dessa célula permite o crescimento de uma população de células tumorais derivadas de clones. O avanço do tumor prossegue conforme as mutações adicionais ocorrem dentro das células tumorais. Essas mutações conferem uma vantagem seletiva à célula, como sobrevivência, invasão e metástase e o processo é denominado seleção clonal. A seleção clonal continua durante todo o desenvolvimento do tumor tornando-os continuamente mais rápidos e malignos (COOPER, 2000).

Propriedades adicionais das células tumorais afetam suas interações com outros componentes do tecido, exercendo papel fundamental na invasão e na metástase. A invasão de células cancerígenas no tecido circundante é o primeiro passo na cascata metastática. As células tumorais iniciam secretando proteases, como as colagenases, que digerem os componentes da MEC, fazendo com que as células cancerígenas penetrem através das lâminas basais e invadam os tecidos normais próximos (COOPER, 2000; ELIA; DOGLIONI; FENDT, 2018).

Sabe-se que as células cancerígenas de alguns tumores podem migrar individualmente ou coletivamente durante o crescimento do tumor. No movimento coletivo, as células envolvidas podem afetar umas às outras por meio de interações de adesão, força e sinalização. A migração celular dirigida é altamente influenciada pela detecção celular de

gradientes locais na concentração de fatores químicos (Figura 1). Este modo de orientação celular é denominado quimiotaxia (CAVIGLIA; MORRO, 2016; RAPE; KUMAR, 2014).

Figura 1 - Migração celular dirigida de células tumorais.



Fonte: Adaptado de Yuan *et al.* (2018) (YUAN *et al.*, 2018)

Esses gradientes de concentração existem para oxigênio, pH e componentes solúveis, como nutrientes e moléculas efetoras, além dos metabólitos celulares. Eles são influenciados pela proximidade de vasos sanguíneos, pela difusão de moléculas através da MEC e, logo, pela composição da MEC, pelo metabolismo celular que regula o consumo de oxigênio e nutrientes e a geração de resíduos celulares. Os gradientes de concentração molecular atingem diferentes comportamentos celulares, entre eles a motilidade, migração e sinalização celular e são fundamentais na quimiotaxia e morfogênese no desenvolvimento normal e na cicatrização de feridas. Em situações que envolvam proximidade de um vaso sanguíneo, pequenos tumores avasculares ou metastáticos exibem um gradiente nos níveis de oxigênio, permitindo uma região proliferativa e um núcleo hipóxico com células inativas (quiescentes) e mais resistentes à quimioterapia, imunoterapia e radioterapia (LANGHANS, 2018).

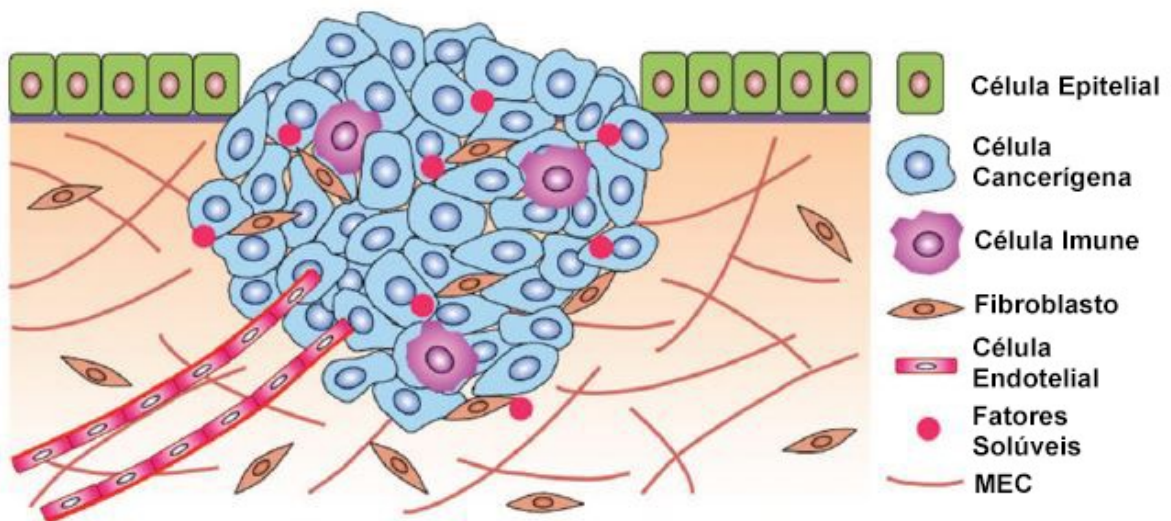
A progressão do câncer é muitas vezes descrita como um *continuum*, em que no decorrer do tempo a célula muda de uma fase benigna para um fenótipo invasivo e metastático, ao passo que responde a vários sinais do microambiente ao longo do processo (EMON *et al.*, 2018).

3.1.3 Microambiente Tumoral

Os tumores sólidos são caracterizados por uma organização estrutural muito complexa e heterogênea, onde células cancerígenas, estroma tumoral e MEC estão fortemente entrelaçadas e interagem entre si em um ambiente 3D (ZANONI et al., 2019).

O microambiente tumoral consiste de células não tumorais (como fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e células do sistema imunológico) e MEC, que é altamente variável e dependente do tipo de tumor e localização, como pode ser visualizado na Figura 2 (LANGHANS, 2018). O microambiente tumoral também é caracterizado por diferentes gradientes bioquímicos (nutrientes, fatores de crescimento solúveis e oxigênio) e sinais físicos que podem alterar o comportamento da célula tumoral, permitindo que exibam variações fenotípicas distintas nas diferentes regiões da massa tumoral e respondam de maneira diferente a tratamentos específicos (ZANONI et al., 2019).

Figura 2 - Microambiente Tumoral.



Fonte: Adaptado de Ham *et al.* (2016) (HAM et al., 2016).

A MEC é constituída essencialmente por glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e colágenos, e desempenha um papel importante em inúmeros processos biológicos influenciando a penetração e resposta de drogas. As células estromais interagem com a MEC secretando fatores, alterando o fenótipo e se reorganizando (ZANONI et al., 2019). Por isso, a presença desses fatores bioativos secretados por fibroblastos, células

inflamatórias e vasos sanguíneos na MEC desempenha papéis importantes no desenvolvimento do câncer (RIJAL; LI, 2016). A interação entre as propriedades biofísicas das células e a MEC determina uma reciprocidade dinâmica entre as células neoplásicas e o estroma tumoral e essa reciprocidade dinâmica parece regular muitas respostas celulares envolvidas na tumorigênese, entre elas o começo da metástase. Entre os participantes nas interações biofísicas podemos citar a rigidez da matriz, viscoelasticidade, densidade e proteínas de reticulação, configuração da rede de fibras e rigidez das células cancerígenas (EMON et al., 2018).

As condições físico-químicas, como os níveis locais de oxigênio, o pH, a rigidez/força, metaloproteinases de matriz (MMPs) secretadas por outras células vizinhas, contribuem para os fenótipos gerais das células cancerígenas na MEC (RIJAL; LI, 2016). Entre as interações célula-célula podemos destacar as interações com as células endoteliais. As células endoteliais em cocultura demonstraram retro-estimular células cancerígenas de mama produzindo o aumento de fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiopoietina-2 (ANGPT2), que provocaram a rápida formação de redes e tubos de interconexão de células endoteliais, enquanto as células cancerígenas cultivadas sozinhas geravam VEGF em menor dimensão. Além disso, as MMPs produzidas pelas células endoteliais e/ou pelas células cancerígenas são capazes de interagir com os substratos moleculares da MEC e mediar a invasão e a tubulogênese das células endoteliais (RIJAL; LI, 2016).

As células endoteliais são importantes na progressão do câncer, contudo a influência da rigidez do tumor no epitélio é amplamente desconhecida. Por isso, os novos sistemas de dispositivos em desenvolvimento mostram uma maior compreensão de como as células endoteliais criam uma rede vascular no estroma do tumor e facilitam o fornecimento de nutrientes e oxigênio ao núcleo hipóxico, onde o estresse sólido e a pressão do fluido intersticial são altos. Além disso, as células endoteliais secretam diversos fatores angiogênicos, como ANGPT2, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento insulínico (IGF), interleucina (IL), fator estimulador granulócitos (CSF) e fator derivado de células estromais-1 (SDF1) que promovem a progressão metastática. Além disso, as células endoteliais atuam na remodelação da MEC para estabelecer nichos vasculares no estroma e suas membranas basais compreendem diversos componentes da MEC, sendo eles a laminina $\alpha 4$, fibronectina, hialuronano e colágeno- α tipo IV e servem como um armazenamento de várias citocinas e fatores de crescimento (EMON et al., 2018).

Shoval et al. (2017) desenvolveram esferoides de diferentes células tumorais com células endoteliais e concluíram que cada tipo de tumor gera diferentes interações com as células endoteliais e pode apresentar estruturas vasculares que podem brotar ao interagir com a MEC (SHOVAL et al., 2017).

3.1.4 Angiogênese Tumoral

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, processo posterior a vasculogênese, formação de novos vasos sanguíneos *in situ* (FUS; GÓRNICKA, 2016). É um processo complexo que decorre em várias etapas e envolve a interação entre diferentes tipos celulares, como celulares epiteliais (CE), células murais e fibroblastos, a MEC, diversas citocinas e fatores de crescimento, sendo regulada pelo balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos (IRVIN et al., 2014; NEGRÃO, 2011; VIEIRA, 2014). Os principais fatores pró-angiogênicos são: o VEGF, óxido nítrico (NO), integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, TGF- β , FGF, MMPs e CCL2/JE//MCP-1 e entre os fatores anti-angiogênicos podemos destacar: a trombospondina, angiostatina, endostatina, vasostatina e inibidores de metaloproteinases (TIMP) (VIEIRA, 2014).

A angiogênese desempenha um papel tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (IRVIN et al., 2014). Em situações fisiológicas, o processo ocorre no desenvolvimento embrionário, reparo tecidual e durante o ciclo reprodutivo feminino. Já em situações patológicas aparece em artrite reumatoide, retinopatia diabética, doenças inflamatórias crônicas e crescimento tumoral (VIEIRA, 2014).

O crescimento de tumores sólidos necessita dentre outras coisas de um suprimento sanguíneo adequado. As células não sobrevivem se não receberem oxigênio e nutrientes ou se forem incapazes de liberar seus resíduos metabólicos como algumas moléculas tóxicas. Portanto, a angiogênese é essencial para o crescimento tumoral e para a ocorrência de metástases (PEREIRA et al., 2008).

No início do crescimento tumoral, o tumor consegue crescer através da difusão passiva de oxigênio e nutrientes do estroma circundante sem precisar dos vasos sanguíneos, esse estágio pré-vascularizado do crescimento do tumor sólido pode ser identificado pela capacidade proliferativa desinibida. Entretanto, a lesão tumoral segue crescendo e as células em seu núcleo entram em hipóxia e privação de nutrientes e passam a acumular fatores de

indução de hipóxia, provocando uma alteração fenotípica conhecida como o interruptor angiogênico, que leva ao recrutamento de células endoteliais locais. Os vasos são formados em resposta a fatores de crescimento, secretados pelas células tumorais, que estimulam a proliferação de células endoteliais nas paredes de capilares no tecido circundante, resultando no crescimento de novos capilares no tumor (SZOT et al., 2011). Os tumores sólidos então evoluem de um estado avascular para um estado vascular respondendo ao *stress* hipóxico no microambiente e iniciando uma resposta angiogênica da vasculatura no hospedeiro. As células cancerígenas que não conseguem se ajustar às deficiências de oxigênio e nutrientes no núcleo da massa tumoral crescente acabam sucumbindo à morte celular por apoptose ou necrose (FOLKMAN, 1971; SONG; PARK; GERECHT, 2014; SZOT et al., 2011).

Logo, a evolução do melanoma está diretamente ligada ao grau de atividade angiogênica, com o aumento da expressão de fatores pró-angiogênicos e seus respectivos receptores (CARDOSO, 2018). Uma superprodução de fatores pró-angiogênicos ocorre quando há excessiva proliferação das células tumorais seguida de desenvolvimento da hipóxia. Os altos níveis de expressão de fatores de crescimento pró-angiogênicos e MMPs foram indicadores de tumor maligno in vivo. (CHEN et al., 2012; SONG; PARK; GERECHT, 2014; VERBRIDGE; CHANDLER; FISCHBACH, 2010)

O processo de angiogênese tumoral inicia com a dilatação de um vaso sanguíneo, permitindo maior permeabilidade (LOPES, 2018). Um novo brotamento angiogênico surge pela regulação dos gradientes de VEGF e ativação dos ligantes de *Notch* nas células endoteliais. As células que acabam expressando esses receptores de VEGF e ligantes de *Notch* tornam-se não proliferativas e são chamadas de células *tip*. Essas células produzem filopodia que se estendem para dentro do ambiente. As células vizinhas das células *tip* que expressam o *Notch* tornam-se as células *stalk* que são proliferativas e contribuem com o alongamento do novo broto, formando assim o lúmen. O processo de formação de lúmens é denominado tubulogênese (TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2012; XU; CLEAVER, 2011).

Os novos capilares formados ativamente em resposta a estimulação angiogênica são facilmente penetrados pelas células tumorais, proporcionando uma oportunidade imediata para que as células cancerígenas entrem no sistema circulatório e iniciem o processo metastático (COOPER, 2000; SZOT et al., 2011). A estrutura vascular do tumor é diferente a existente nos tecidos saudáveis, pois há a presença de regiões de hipervascularização juntamente com áreas de ausência ou poucos vasos sanguíneos (CARDOSO, 2018).

A vascularização tumoral é uma característica importante para o desenvolvimento do melanoma e sua ocorrência está associada com a agressividade, risco de recorrência e a taxa de resposta aos tratamentos (CARDOSO, 2018). Por isso, inúmeros estudos mostram a importância da angiogênese na metástase. Folkman (1972) foi um dos primeiros a evidenciar que a metástase de um tumor sólido primário dependia da presença de vascularização, além de presumir que a inibição da angiogênese poderia ser terapêutica (FOLKMAN, 1972). A partir de então, inúmeros estudos mostraram a importância e o papel da angiogênese na metástase de tumores, sendo assim o foco de pesquisas atuais. Ko e colaboradores (2019) estabeleceram um modelo de esferoide tumoral com angiogênese induzida (Sphero-IMPACT) para utilização em *screening* de fármacos (KO et al., 2019). Cardoso (2018), investigou o potencial angiogênico das células de melanoma após monitorar a ativação de células endoteliais em contato com o meio condicionado do *shear* (CARDOSO, 2018).

3.2 SELEÇÃO DE FÁRMACOS ANTICÂNCER

Fármaco é definido como uma droga que tem sua estrutura química definida e seus efeitos no organismo são conhecidos, sendo eles benéficos. Medicamentos são produtos feitos a partir de fármacos. Já droga é qualquer substância que cause alguma alteração fisiológica no organismo, seja ela favorável ou não (GUIMARÃES; TAVEIRA, 2014). Atualmente há inúmeros esforços para descobrir possíveis novas drogas com atividade antitumoral (SONG; PARK; GERECHT, 2014) e os tratamentos contra o câncer tem obtido grande avanços, disponibilizando de melhorias significativas para os pacientes (IQVIA INSTITUTE, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2018) em 2017 foram gastos em todo o mundo US\$ 133 bilhões em medicamentos para câncer e cuidados de suporte e os números continuam a crescer, com 63 medicamentos anticâncer lançados nos últimos cinco anos (IQVIA INSTITUTE, 2018; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Em 2018, os 10 medicamentos contra câncer mais vendidos geraram US\$ 63,58 bilhões em vendas, entre eles o Avastin (Roche), anticorpo direcionado ao VEGF (PHILIPPIDIS, 2019).

A maioria dos medicamentos aprovados pelo FDA são voltados para a replicação do DNA e para as vias de reparo. Porém, hoje um dos principais alvos das novas drogas é a angiogênese e os medicamentos inibidores de angiogênese visam as interações entre as células e a MEC. Portanto, a relação câncer – MEC está ganhando cada vez mais destaques

em pesquisas atuais, pois as formas como elas interagem podem afetar diretamente a eficácia do tratamento (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016; SONG; PARK; GERECHT, 2014).

Os fármacos são desenvolvidos a partir de uma sequência de testes e ensaios, incluindo testes *in vitro* que devem ser acompanhados de avaliação de segurança e eficácia em ensaios clínicos. Muitas drogas mostram um comportamento citotóxico em células de câncer *in vitro*, porém *in vivo*, em muitos casos, perdem sua eficácia, isso se deve a pouca compreensão dos efeitos quimiorresistentes conferidos pelo microambiente tumoral. Vários tipos celulares de câncer provaram usar das suas interações com o ambiente circundante para obter resistência aos medicamentos. As interações podem ser barreiras físicas ao tratamento, por exemplo hipóxia, pH e pressão do fluido intersticial e resistência a drogas baseada na adesão celular, por exemplo organização da célula-MEC e ligação do ligante de proteção. Dessa forma, a maioria das drogas anticâncer evidenciam uma penetração limitada nos tumores sólidos. (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016).

Assim, novas matrizes artificiais tem surgido, como por exemplo o uso de *scaffolds*, no campo de cultura celular tumoral, que tentam mimetizar esse microambiente, principalmente com as interações célula-célula e MEC (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016).

As interações célula-célula, produção e deposição de MEC, áreas hipóxicas locais, gradientes de pH e nutrientes são características de modelos esferoides 3D. Esses fatores microambientais definem o comportamento e as funções das células alterando a expressão de genes e proteínas e, assim, a penetração, resposta, resistência e metabolismo das drogas (ZANONI et al., 2019).

3.3 CULTURA CELULAR 2D *VERSUS* 3D

As células cancerígenas são diferenciadas das células normais por sua taxa de crescimento e morfologia, pois as células normais têm sua taxa de proliferação reduzida e mantem sua posição espacial, enquanto as células cancerígenas crescem mais rápido e invadem outras regiões e podem se agrupar formando esferoides tumorais multicelulares. Quando esses são cultivados em *scaffolds* podem ser utilizados como modelos *in vitro* para acompanhar a arquitetura precoce de tumores, a expressão gênica tumorigênica, a resposta a drogas e a invasão dos esferoides mostrando eventos metastáticos precoces. A utilização de hidrogéis como *scaffolds* permitem tentativas de engenhar uma vasculatura *in vitro*, apesar de seu uso ainda ser recente para a simulação da angiogênese tumoral *in vivo* e tem sido explorada para projetar a vasculogênese e angiogênese avaliando a capacidade angiogênica

das células e tecidos cancerígenos. Por conseguinte, as possibilidades para possíveis estudos clínicos se expandem desde a otimização dos parâmetros do hidrogel para modelagem da angiogênese tumoral até para rastreamento de drogas antiangiogênicas (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016; SONG; PARK; GERECHT, 2014).

A maioria dos estudos de câncer *in vitro* eram realizados em culturas de monocamada 2D e embora as técnicas de cultura 2D tenham avançado nossa compreensão sobre o câncer, esse formato reflete deficientemente o contexto do microambiente dos tumores *in vivo*, pois as células são cultivadas em uma superfície de plástico e assim não é possível observar as interações célula-MEC, que são indispensáveis para o crescimento do tumor e angiogênese. Dessa forma, os modelos 2D não estão aptos para replicar um fenótipo *in vivo* (SONG; PARK; GERECHT, 2014; SZOT et al., 2011; VERBRIDGE; CHANDLER; FISCHBACH, 2010).

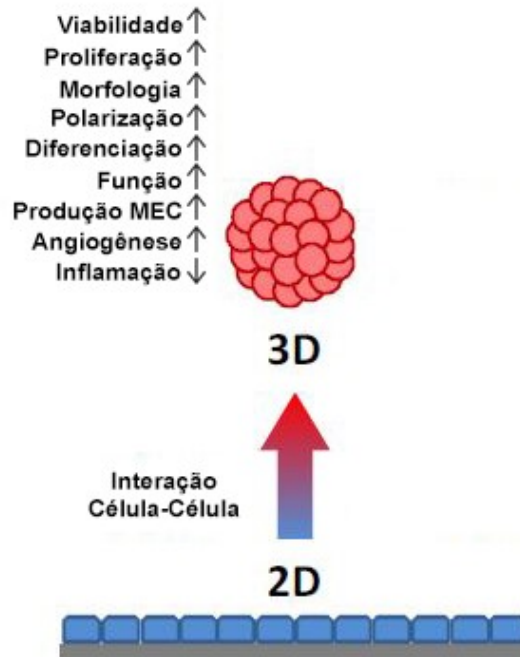
Estudos relatam que a deposição de MEC, que é essencial para a proliferação celular e expressão gênica, foi diminuída em culturas de monocamadas de células cancerígenas. Os fenótipos malignos das células cancerígenas também foram drasticamente reduzidos quando as células foram transferidas das condições *in vivo* para placas de cultura 2D. Desse modo, as ações dos fármacos que funcionariam nas interações célula-célula e transição epitélio-mesenquimal (EMT) foram reduzidas. Por isso, as células cancerígenas quando cultivadas em 2D representam pobremente as condições fisiológicas *in vivo* (CHEN et al., 2012).

Portanto, os modelos em 2D de desenvolvimento de tumores têm sido até o momento inadequados para a descoberta de tratamentos definitivos e prevenção do câncer e esses modelos podem causar resultados errôneos e permitir orientações equivocadas para os ensaios clínicos futuros. Sendo assim, uma alternativa para as desvantagens relatadas é o uso de modelos de tumores 3D, que possui o potencial de ocupar esse espaço entre os sistemas de culturas 2D e xenoenxertos *in vivo* (SONG; PARK; GERECHT, 2014; SZOT et al., 2011; VERBRIDGE; CHANDLER; FISCHBACH, 2010).

Há um aumento dos estudos sobre o câncer empregando modelos de cultura 3D e muitos constataram respostas significativamente diferentes das encontradas em modelos 2D tradicionais (Figura 3). Com o estímulo das interações célula-célula e célula-MEC, os modelos 3D suportam maior liberação de fatores de crescimento vascular, maior agressividade e potencial metastático, menor proliferação, maior resistência a drogas

anticâncer e radioterapia e perfis fisiológicos de expressão gênica, características essas todas encontradas nas células tumorais in vivo (SONG; PARK; GERECHT, 2014).

Figura 3 - Comparação entre os modelos 2D e 3D.



Fonte: Adaptado de Laschke e Menger (2017) (LASCHKE; MENGER, 2017).

Modelos 3D estão começando a restabelecer as morfologias celulares e fenótipos encontrados no decorrer do desenvolvimento do tumor in vivo. Os modelos 3D permitem que as interações entre célula-célula e célula-MEC atuem diretamente na morfologia, no perfil de expressão gênica, na resistência a drogas e em outros comportamentos para diferentes tipos de células tumorais, o que não pode ser alcançado usando modelos de cultura 2D. As células quando cultivadas em um ambiente 3D in vitro possuem a capacidade de adquirir fenótipos e responder a estímulos parecidos aos sistemas biológicos in vivo. Por isso, esses modelos 3D tem sido bastante utilizados na engenharia de tecidos e também podem ser empregados no desenvolvimento de um modelo de tumor in vitro fisiologicamente considerável (SONG; PARK; GERECHT, 2014; SZOT et al., 2011).

No entanto, modelos in vivo com uso de animais de pequeno porte ainda são os principais veículos utilizados para determinar a eficácia do medicamento. Um dos principais problemas com testes de drogas em animais é que muitos medicamentos novos apresentam um bom resultado em testes pré-clínicos em animais, só que falham em testes clínicos em

humanos, perdendo tempo e dinheiro significativos. A falta de sucesso é decorrência das diferenças celulares e genéticas significativas entre humanos e animais. O uso de animais e testes *in vivo* contêm intrinsicamente muito fatores incontroláveis, incluindo células hospedeiras, resposta imune, hemodinâmica e fatores de crescimento endógeno. Essas variáveis podem comprometer o teste terapêutico, pois é complicado isolar o impacto de estímulos específicos como sinais celulares, químicos e mecânicos (SZOT et al., 2011).

Contudo, modelos animais ainda devem ser empregados durante os ensaios pré-clínicos, mas em conjunto com sistemas de cultura de células 3D (SZOT et al., 2011). Embora algumas questões ainda precisem ser esclarecidas, há um grande potencial para melhorar as plataformas de triagem de medicamentos utilizando esferoides 3D, pois eles permitem recapitular melhor o ambiente fisiopatológico 3D de tumores clínicos (ZANONI et al., 2019).

3.3.1 Esferoides

Os modelos de cultura 3D possuem maior capacidade de reproduzir a morfologia *in vivo*, a conectividade celular, polaridade, expressão gênica e arquitetura de tecidos, sendo assim mais relevantes fisiologicamente do que os modelos 2D. Logo, os modelos 3D fornecem mais dados preditivos para testes *in vivo*. Por isso, nos últimos anos, foram desenvolvidos uma variedade de sistemas de cultura 3D para descoberta de drogas, biologia de células cancerígenas, estudo com células-tronco, tecidos funcionais projetados para implantação entre outros (EDMONDSON et al., 2014; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2019). Uma das formas mais comuns e versáteis de cultivar células em 3D são os esferoides multicelulares, agregados celulares esféricos tridimensionais.

Os esferoides se formam sozinhos a partir de aglomerados esféricos de células, criados com culturas únicas ou com técnicas de cocultura, como métodos de gota suspensa, cultura rotativa ou placa côncava (ZANONI et al., 2016).

O método gota suspensa consiste em cultivar as células em uma gota de meio colocada em uma placa para facilitar a formação de pequenas gotículas de meio contendo as células. A formação dos esferoides acontece na interface ar-líquido. Nas culturas rotativas, as células são mantidas em movimento constantemente, diminuindo a adesão e aumentando a interação célula-célula (ZANONI et al., 2019).

Os métodos mais comuns como a gota suspensa, cultura de pellet e cultura rotativa possuem algumas fragilidades, como a dificuldade no controle do tamanho uniforme dos esferoides, são processos demorados e indisponíveis para detecção em tempo real e *in situ* (YUAN et al., 2018). Outro método muito empregado é usando micromolde de hidrogéis não aderentes, como a agarose. Esse método é simples semeando a suspensão celular com pipetagem única no micromolde de agarose, onde as células afundam nos buracos já formados no micromolde. Como a superfície do hidrogel não é aderente para as células, a ligação célula-célula fica favorecida (NAPOLITANO et al., 2007; STUART et al., 2017).

Exemplos de esferoides incluem os MCTS, neuroesferas, mamesferas, hepatosfera e corpos embrioides. Os esferoides de tumores podem ser estabelecidos em termos de tamanho e composição celular, é possível obter esferoides compostos por um único tipo de célula (esferoides homotípicos) ou vários tipos de células (esferoides heterotípicos) (ZANONI et al., 2019).

Os modelos tridimensionais de MCTS, são os modelos mais extensamente utilizados, pois se assemelham mais aos tumores sólidos *in vivo* e dessa forma fornecem ferramentas valiosas para a identificação *in vitro* de possíveis alvos farmacológicos antineoplásicos (GONG et al., 2015). Os MCTS reproduzem alguns importantes fatores-chave de tumores reais como: a formação de gradientes difusivos de oxigênio, nutrientes e resíduos metabólicos, a organização de células em camadas com diferentes taxas de proliferação, a presença de interações celulares e sinalização, a expressão de padrões genéticos específicos e a quimiorresistência (LAZZARI et al., 2018).

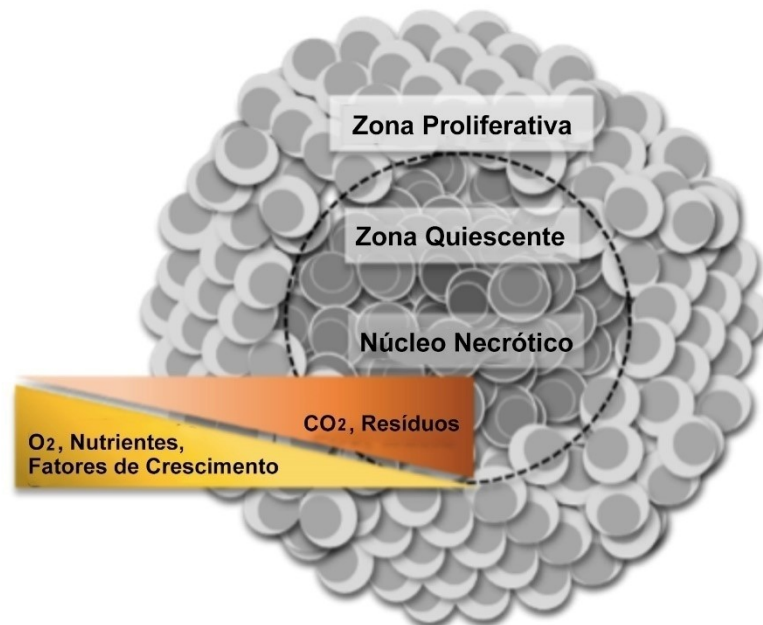
O crescimento dos esferoides, como dos tumores sólidos, é caracterizado por uma fase inicial, onde há um aumento do volume seguido de uma esferoidização (tempo de estabilização). Na esferoidização, os esferoides se tornam mais regulares e diminuem de volume até alcançarem uma espécie de equilíbrio (ZANONI et al., 2019).

Os MCTS são compostos por arranjos concêntricos de células periféricas em proliferação, células intermediárias viáveis, mas quiescentes e um núcleo central necrótico, mimetizando a heterogeneidade celular observada em tumores sólidos, como pode ser visualizado na Figura 4 (GONG et al., 2015). Em um esferoide suficientemente grande, somente as células nas camadas mais externas conseguem receber oxigênio e outros nutrientes necessários para proliferar, sendo essa região denominada zona proliferativa, enquanto as demais zonas são formadas mais profundamente, como a quiescente e a necrótica. As células na zona quiescente permanecem viáveis, mas não proliferam, ao mesmo tempo que as células

mais internas morrem devido ao acúmulo de resíduos tóxicos e a falta de suprimento de oxigênio e nutrientes, gerando a zona necrótica (DINI et al., 2016).

As ligações intercelular e extracelular juntamente com a elevação na pressão intersticial, também propicia uma barreira física à difusão do fármaco que contribui para a resistência aos fármacos, o que não é reproduzido adequadamente nas culturas de células em monocamadas. Portanto, os MCTS viabilizam um valioso modelo de microtumor in vitro 3D para o teste de drogas anticâncer, o que poderia ser mais preditivo e mais preciso na imitação de um nódulo de tumor avascular (GONG et al., 2015).

Figura 4 - Estrutura de um esferoide multicelular tumoral.



Fonte: Adaptado de Thermo Fisher Scientific, Inc. (2019).

As MECs ajudam as células a se movimentarem dentro de seu esferoide de forma parecida ao que ocorre quando as células se movem no tecido vivo. Os esferoides são, portanto, modelos melhorados para migração, diferenciação, sobrevivência e crescimento de células. A interação de células tumorais com a MEC tem um papel importante na estimulação da sinalização microambiental e na formação de MCTS. Os tipos mais utilizados de MEC são o extrato de membrana basal ou colágeno, também há estudos com *scaffolds* baseados em

nanofibras e/ou nanotubos naturais que podem imitar algumas das características topográficas e bioquímicas da MEC, como os hidrogéis (ANTONI et al., 2015; RANJBAR-MOHAMMADI et al., 2019).

Os *scaffolds* de hidrogéis oferecem para o crescimento dos MCTS um amplo espectro de pistas biofísicas e bioquímicas que possibilitam recapitular o comportamento da MEC natural, essencial para regular o comportamento das células cancerígenas (LI; KUMACHEVA, 2018).

3.4 HIDROGÉIS

Os hidrogéis são redes tridimensionais compostas de polímeros hidrofílicos reticulados através de ligações covalentes ou mantidos juntos através de atração física intramolecular e intermolecular. Os hidrogéis possuem a capacidade de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos e inchar rapidamente sem se dissolver. Sua alta hidrofiliidade se deve particularmente a presença de porções hidrofílicas, tais como grupos carbóxico, amida, amino e hidroxilo distribuídos ao longo da cadeia principal das cadeias poliméricas. Quando estão inchados, os hidrogéis são macios e emborrachados, recordando em grande parte os tecidos vivos (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; SONG; PARK; GERECHT, 2014).

O uso de hidrogéis engloba uma ampla gama de aplicações como a entrega de medicamentos, cicatrização de feridas, materiais oftálmicos e engenharia de tecidos. Os hidrogéis são utilizados para produzir modelos 3D in vitro de tecidos, graças as suas propriedades biofísicas parecidas com a MEC. Os materiais de hidrogel podem proporcionar microambientes dinâmicos, que permitem regular o destino das células por meio das interações célula-célula ou célula-MEC. Os hidrogéis podem ser alterados, a fim de ajustar a resistência mecânica e as estruturas químicas do microambiente celular com o propósito de apresentar sítios de ligação celular, como Arg-Gly-Asp (RGD) e sítios degradáveis da MMP que são essenciais para estimular respostas celulares específicas como a progressão tumoral, migração endotelial e angiogênese tumoral (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; SONG; PARK; GERECHT, 2014; SZOT et al., 2011).

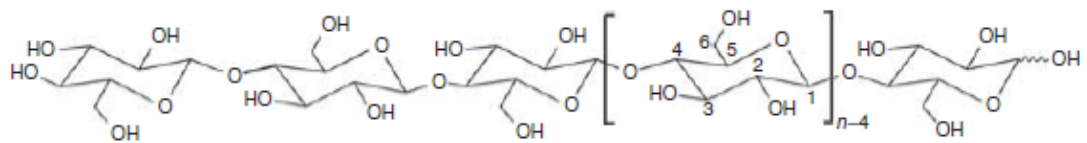
Muitos estudos empregando hidrogéis poliméricos naturais ou sintéticos mostraram com êxito a vasculogênese a partir das células endoteliais, assim os hidrogéis oferecem uma importante plataforma para ajuste fino e recapitulação do microambiente tumoral e angiogênico. Entre os hidrogéis poliméricos foram relatados anteriormente o uso potencial de

scaffolds nanofibrosos, como a nanocelulose bacteriana para a engenharia de tecidos em modelos tumorais in vitro (REIS et al., 2017; SONG; PARK; GERECHE, 2014; SZOT et al., 2011).

3.4.1 Nanocelulose Bacteriana (BNC)

A BNC é um polissacarídeo extracelular produzido por vários gêneros de bactérias sendo particularmente o gênero *Komagataeibacter* o mais eficiente produtor. As espécies mais utilizadas são a *Komagataeibacter hansenii* e *Komagataeibacter xylinus*. A nanocelulose bacteriana é quimicamente idêntica a celulose de plantas, porém é livre de subprodutos como lignina, pectina e hemiceluloses, caracterizando uma rede única reticulada de fibras finas. A BNC possui uma estrutura molecular de conexões repetidas de D-glicose (dextrose) como pode ser visto a partir da fórmula molecular na Figura 5 (BACAKOVA et al., 2019; GATENHOLM, PAUL; KLEMM, 2010)

Figura 5 - Estrutura molecular da BNC (n= graus de polimerização).



Fonte: Gatenholm (2011).

As membranas de BNC são em sua essência assimétricas, ou seja, quando cultivadas sob condições estáticas, como por exemplo em placas de cultura, o lado superior é mais denso em fibras e exibe uma superfície emaranhada, já o lado inferior possui a característica de ter uma rede mais porosa, pois suas fibras estão menos densas e mais distribuídas espacialmente (BERTI et al., 2013). Berti *et al* (2013). e dos Reis *et al.* (2017) constataram comportamentos celulares distintos nos dois lados da BNC para células endoteliais (HUVECs) e células de melanoma (SK-MEL-28), respectivamente (BERTI et al., 2013; REIS et al., 2017).

A BNC é quimicamente pura e pode ser produzida em vários tamanhos e formas. Os materiais a base de BNC geralmente possuem alta resistência mecânica, inércia química e propriedades morfológicas, físicas, químicas, elétricas, térmicas e ópticas personalizáveis,

biocompatibilidade sem toxicidade ou com baixa toxicidade e baixa imunogenicidade. Além disso, a BNC é um material de baixo custo e com alta disponibilidade e renovabilidade (BACAKOVA et al., 2019; KUZMENKO et al., 2013).

A BNC tem uma morfologia de redes de nanofibras que imita, até certo ponto, propriedades da MEC. A natureza hidrofílica da BNC faz com que ela se ligue fortemente à água, comportando-se como um hidrogel. Diferente da maioria dos polímeros sintéticos, a BNC é biocompatível e mostra integração tecidual. Suas propriedades mecânicas únicas são muito semelhantes aos tecidos moles, logo tem se mostrado um suporte bastante interessante e promissor para aplicações biomédicas, como *scaffolds* para a engenharia de tecidos (PETERSEN; GATENHOLM, 2011; SASKA et al., 2017). Apesar de suas excelentes propriedades a BNC não possui moléculas sinalizadoras, assim a imobilização de proteínas presentes na MEC na BNC se torna uma alternativa para a guiar o comportamento celular.

Para melhorar a adesão celular nos biomateriais, a abordagem mais eficaz tem sido imitar a MEC. Entre as proteínas mais frequentemente usadas temos as fibronectina e o colágeno, visto que são as proteínas mais abundantes na MEC e envolvidas nas interações celulares (KUZMENKO et al., 2013). Alguns autores já descreveram a combinação de BNC com colágeno para *scaffolds* de engenharia tecidual (BACAKOVA et al., 2019; KUZMENKO et al., 2013; MEYER; DOS REIS; PORTO, 2019; SASKA et al., 2017; ZHIJIANG, CAI; YANG, 2011).

3.5 COLÁGENO

A MEC é uma malha fibrosa com uma complexa composição que compreende glicosaminoglicanos (como ácido hialurônico e heparina), proteoglicanos (como perlecano e sindecano), fatores de crescimento e proteínas (como laminina, fibronectina, elastina e colágeno), (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016).

O colágeno é a principal proteína estrutural encontrada na MEC e representa cerca de 30% do total de proteínas e 25% da composição do peso seco total dos mamíferos. Está presente na maioria dos tecidos duros e moles do corpo humano, incluindo ossos, pele e tendões, desempenhando um papel central na manutenção da integridade biológica e estrutural da MEC e no suporte físico aos tecidos. Ele atua também de forma flexível e dinâmica no comportamento celular (DONG; LV, 2016; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Até o momento já foram identificados pelo menos 28 tipos distintos de colágeno e classificados segundo a sua composição e característica estrutural. Os colágenos dos tipos I, II e III são conhecidos por formar as fibras de colágenos, sendo relevante a classe I que representa a estrutura clássica de fibras compactadas. O colágeno tipo I é o mais utilizado na área da engenharia de tecidos e é predominante na maioria dos tecidos animais, como por exemplo a pele, que cerca de 70 a 80% de seu peso seco corresponde ao colágeno tipo I (CEN et al., 2008; DONG; LV, 2016; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010; UNSWORTH et al., 2015; ZHANG et al., 2018b).

Apesar das excelentes propriedades biológicas, o colágeno tem seu uso limitado na engenharia de tecidos, devido as suas propriedades mecânicas. Os *scaffolds* de colágeno puro não possuem força mecânica e estabilidade estrutural, portanto são utilizados em tecidos específicos, como pele, vasos sanguíneos e tendões. (CEN et al., 2008; UNSWORTH et al., 2015; ZHANG et al., 2018b). Por isso, existem combinações de colágeno com diferentes biopolímeros, a fim de melhorar as propriedades mecânicas e estruturais dos *scaffolds*. Essas combinações podem ocorrer através de métodos físicos ou químicos (DONG; LV, 2016; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

O colágeno produz um ambiente extracelular natural, que é fundamental para a comunicação celular (ZHIJIANG, CAI; YANG, 2011). Ele é o principal componente do microambiente tumoral podendo contribuir no comportamento das células cancerígenas (Figura 6). O aumento na deposição de colágeno estimula a proliferação de células cancerígenas, destacando a importância desses *scaffolds* na progressão do câncer (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016). Neste trabalho, o colágeno I foi imobilizado na superfície de hidrogéis BNC, com a finalidade de aumentar a adesão, a proliferação e a função das células.

Figura 6 - A contribuição do colágeno para as células cancerígenas.



Fonte: Adaptado de Xu *et al.* (2019).

3.6 DOXORRUBICINA

A Doxorubicina é um agente quimioterápico do grupo das Antraciclinas, sendo um dos mais potentes e empregado em diversos regimes quimioterápicos para vários tipos de tumores (DA SILVA *et al.*, 2017). Como as células cancerígenas se replicam mais rapidamente do que as células normais, é possível o uso de drogas não específicas, como a doxorubicina, para tratar tumores quando terapias direcionadas não estão disponíveis (DENARD; LEE; YE, 2012). Porém, a doxorubicina tem sua utilidade um pouco limitada devido a sua ampla toxicidade em células não tumorais, ou seja, causa danos aos tecidos saudáveis, complicando o tratamento e impactando na qualidade de vida dos pacientes (SRINIVASAN; RAJABI; MOUSA, 2016; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007).

O mecanismo de ação da doxorubicina na inibição da proliferação das células cancerígenas ainda não está completamente esclarecido (DENARD; LEE; YE, 2012; TAYMAZ-NIKEREL *et al.*, 2018). Um dos mecanismos propostos é através da intercalação do fármaco no DNA e inibição da topoisomerase II, levando a alterações na estrutura da cromatina. Outra proposta é a geração de radicais livres, ocasionando danos oxidativos às

biomoléculas, danificando o DNA e resultando em morte celular (TAYMAZ-NIKEREL et al., 2018).

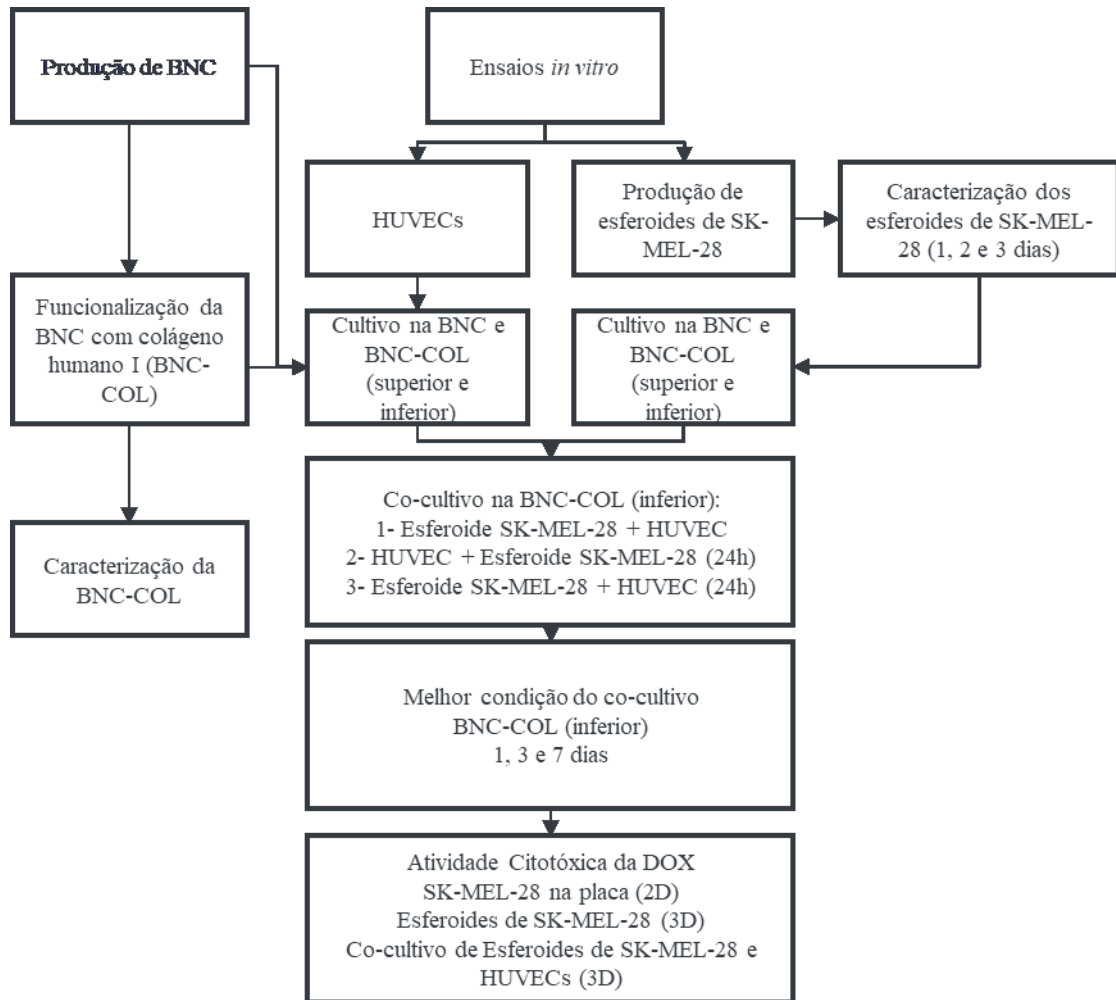
Logo, a DOX é um dos fármacos mais utilizados nas pesquisas de desenvolvimento de plataformas para *screening* de drogas (BARROS et al., 2018; GONG et al., 2015; WANG et al., 2013). Por essa razão, ela foi utilizada nesse trabalho como fármaco modelo.

4 MATERIAS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), com colaboração do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O trabalho experimental foi elaborado de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 7. O trabalho inicia-se com a produção de BNC e finaliza-se com o ensaio de avaliação de citotoxicidade da doxorubicina (DOX) nos três modelos testados.

Figura 7 - Fluxograma geral das metodologias empregadas neste trabalho.



Fonte: Autora (2019).

4.1 PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA

4.1.1 Linhagem, meio e condições de cultura bacteriana

A linhagem bacteriana utilizada foi a *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769). A cepa foi estocada em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Nuair), em meio contendo 20% de glicerol (Dinâmica), reativada em meio manitol (KASVI) e mantida em placa ágar manitol (ágar 15 g/L) (KASVI), a pH 6,5. O meio manitol continha 25 g de manitol, 5 g de extrato de levedura (KASVI) e 3 g de peptona (KASVI) dissolvidos em 1 L de água destilada. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,6 e autoclavado por 20 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

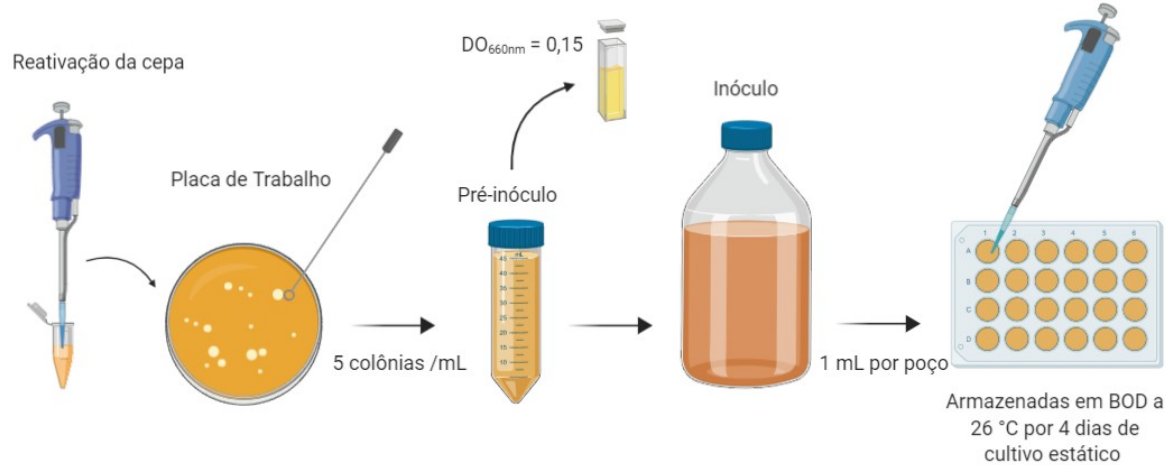
4.1.2 Reativação da cepa e produção da placa de trabalho e/ou manutenção

A bactéria *Komagataeibacter hansenii* foi reativada em 4 mL de meio manitol e 100 µL desta solução foram plaqueados em placa ágar-manitol e colocados na incubadora BOD (Nova Ética) a 26 °C por 5 dias (placa de reativação). A placa de trabalho foi preparada a partir da placa de reativação, cinco colônias foram isoladas provenientes da placa de reativação e ressuspensas em 1 mL de meio manitol. Para homogeneizar, a solução foi agitada em vórtex (Vision) por 60 s e esperou-se decantar para a leitura de densidade óptica (DO). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices), a 660 nm (valor de referência $DO_{660}=0,15$). Após a leitura, realizou-se a diluição seriada até 10^{-5} , sendo plaqueados 100 µL da solução diluída em placa ágar manitol. As placas foram mantidas na BOD por sete dias a 26 °C. Após o crescimento das colônias isoladas, a placa de trabalho foi utilizada para o procedimento de produção de BNC e a placa de manutenção mantida na BOD por até 15 dias.

4.1.3 Produção do pré-inóculo, inóculo e membranas de BNC

Para o preparo do pré-inóculo, foram inoculadas 30 colônias isoladas da placa de trabalho em 6 mL de meio manitol. O inóculo foi preparado a partir da diluição do pré-inóculo 1:10 em meio manitol. Logo, 5 mL do pré-inóculo foram transferidos e colocados em 45 mL de meio manitol. O inóculo foi então distribuído para a placa de 24 poços, sendo 1 mL em cada poço. As placas de 24 poços foram armazenadas na BOD (Nova Ética) a 26 °C em condições de cultura estática por 4 dias. As membranas de BNC cresceram na interface líquido/ar. Após esse período, as membranas formadas foram retiradas da placa e levadas para a etapa posterior de purificação. O processo de produção de membranas de BNC é apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Processo de Produção de membranas de BNC.



Fonte: Autora (2019).

4.1.4 Purificação das membranas de BNC

As membranas removidas dos poços de cultura foram transferidas para um frasco contendo uma solução 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica), a fim de remover as bactérias e possíveis resíduos do meio de cultura e do metabolismo bacteriano. As membranas foram acondicionadas na estufa a 50 °C por 24 h. Em seguida as membranas foram lavadas sucessivamente com água destilada até atingir o pH da água. E por fim, as membranas foram esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 min e mantidas sob refrigeração até sua utilização.

4.2 FUNCIONALIZAÇÃO DA BNC

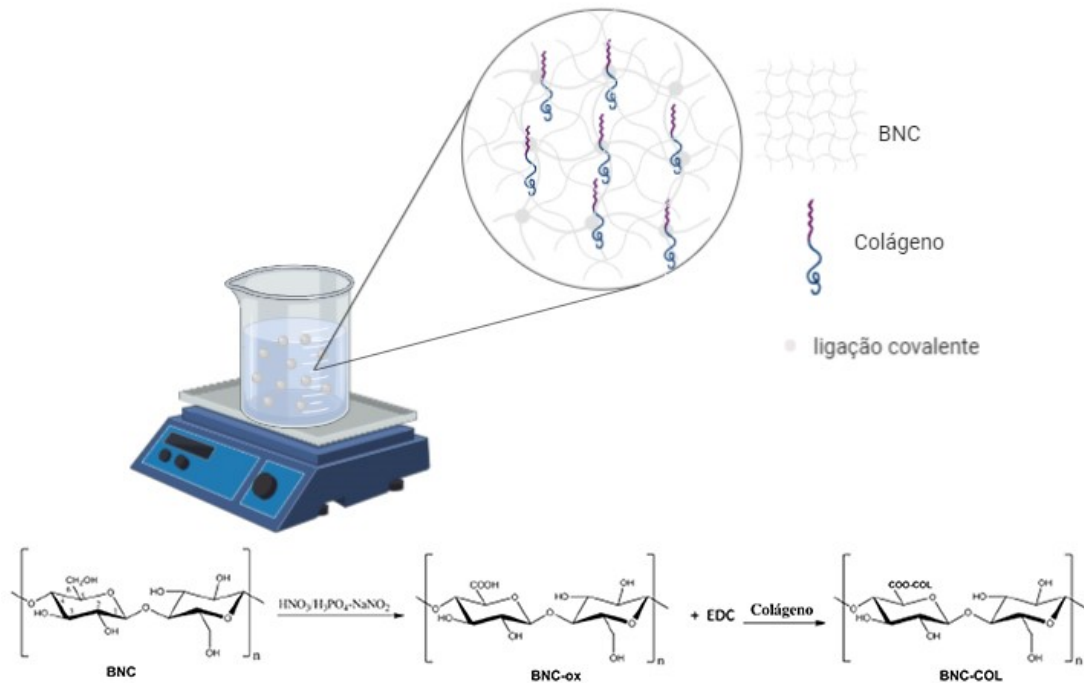
4.2.1 Imobilização de Colágeno I (COL)

A BNC foi oxidada, seguindo o método de Kumar e Yang (2002) com algumas modificações (KUMAR; YANG, 2002). Em uma capela de exaustão, a BNC foi imersa em uma solução de ácido nítrico (NEON) e ácido fosfórico (NEON) 2:1 (v/v) e em seguida foi adicionado 7% de nitrito de sódio (Dinâmica) (m/v). A solução foi coberta com uma placa de

Petri, a fim de impedir a liberação dos gases resultantes da reação para a atmosfera. As membranas de BNC ficaram reagindo nessa solução por 24 h, na ausência de luz, a temperatura ambiente com leve agitação. Depois de retiradas da solução, as membranas foram imersas em uma solução de 0,2% (p/p) de glicerol (Dinâmica) durante 15 min para eliminar o excesso de agente oxidante. Seguidamente as membranas foram lavadas com acetona e secas a temperatura ambiente.

Após a etapa de oxidação modificações químicas foram realizadas nas membranas de BNC oxidadas (BNC-ox) para a imobilização do colágeno através do método de derivatização desenvolvido por Liu e colaboradores (2005) e Li e colaboradores (2008) (LI et al., 2008; LIU et al., 2005). As membranas BNC-ox foram imersas em tampão 0,02M de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado), pH 4,5, contendo EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) / NHS (N-hidroxisuccinimida) 0,01 M (1:1) por 24 h a 4 °C com agitação. Decorrido o período de reação, as membranas foram retiradas da solução e imersas em uma solução de 0,1 mg/mL de colágeno humano tipo I (Sigma-Aldrich) durante 24 h a 4 °C, conforme Meyer e colaboradores (2019) e após foram armazenadas em geladeira (MEYER; DOS REIS; PORTO, 2019). As membranas obtidas foram denominadas membranas de nanocelulose bacteriana com colágeno imobilizado (BNC-COL) (Figura 9). A solução de colágeno restante foi armazenada em geladeira para análise de quantificação de colágeno. Por fim, as membranas de BNC-COL foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e por último com água deionizada.

Figura 9 - Imobilização do Colágeno tipo I na BNC.



Fonte: Autora (2019).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA BNC-COL

4.3.1 Caracterização Química da BNC-COL

Os grupos funcionais da BNC e BNC-COL foram analisados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de infravermelho foram adquiridos no espectrofotômetro Agilent (modelo Carry 600), com resolução de 4 cm^{-1} , varredura de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, utilizando refletância total atenuada.

4.3.2 Quantificação de colágeno imobilizado na BNC por Sirius red

A quantidade de colágeno imobilizado na membrana da BNC foi determinada pelo método de *Sirius red*, como descrito por Marota *et al* (MAROTTA; MARTINO, 1985). A solução de *Sirius red* consiste em 0,1% de *Direct red* F3B (Sigma-Aldrich) diluído em uma solução aquosa saturada de ácido pícrico. A solução de *Sirius red* foi adicionada nas amostras (1:1), que foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 min. As amostras foram

centrifugadas a 10.000 rpm (25 °C) por 3 min. Os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* foram lavados com solução de 0,01 M de ácido clorídrico (HCl) (NEON) e agitados em vórtex para homogeneização e por fim centrifugados a 10.000 rpm (25 °C) por 3 min. O sobrenadante foi descartado e a solução de 0,1 M de hidróxido de potássio (KOH) (Dinâmica) foi adicionada e deixada para reagir por 15 min. Finalmente, a amostra foi transferida para uma placa de 96 poços para realizar a leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Molecular Devices) no comprimento de onda (λ) de 550 nm. A curva padrão foi construída usando a solução de colágeno humano nos intervalos de 0 a 0,1 mg/ml, conforme o Apêndice A.

4.3.3 Caracterização microestrutural da BNC- COL

A microestrutura das superfícies superior e inferior da BNC e BNC-COL foi analisada e caracterizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando um microscópio JEOL JSM-6390LV a 10kV. Para a análise por MEV, os hidrogéis foram congelados (-80 °C por 24 h) e logo após liofilizados (Liobras) durante 24 h. Após secagem, as amostras foram armazenadas em dessecador. Para análise, as amostras liofilizadas foram fixadas sobre as fitas de carbono, que estavam coladas nos suportes de alumínio (*stubs*) e por fim recobertas com ouro. A preparação das amostras e as análises ocorreram no LCME – UFSC.

4.4 ENSAIOS IN VITRO

4.4.1 Cultura de Células

A linhagem aderente SK-MEL-28 é um exemplo de célula de melanoma originária da espécie *Homo sapiens* isolada de tumor localizado na pele. A célula SK-MEL-28 foi cultivada em placas de cultura de tecidos contendo o meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM (Gibco® - Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino - SBF (Gibco® - Invitrogen), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco® - Invitrogen). A SK-MEL-28 utilizada neste trabalho estava entre as passagens 3 e 23.

A linhagem imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foi cultivada em placas de cultura de tecidos contendo *Roswell Park Memorial Institute* – RPMI (Gibco® - Invitrogen) suplementado com 10% de SBF (Gibco® - Invitrogen), 1,5 g/L

de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco® - Invitrogen). As HUVECs foram usadas entre as passagens 57 e 77.

Ambas linhagens celulares foram armazenadas e mantidas em estufa (Ultrasafe, HF 212 UV) com atmosfera de 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C, até atingirem a confluência de 70 – 80%, faixa ideal para sua utilização nos experimentos.

4.4.2 Esferoides de SK-MEL-28

4.4.2.1 Esterilização dos moldes

Os moldes *MicroTissues*® 3D Petri Dish® micro-mold spheroids (Sigma) foram lavados com água ultrapura e autoclavados por 20 min a 120 °C, 1 atm. Logo após foram secos em estufa a 60 °C.

4.4.2.2 Preparo da Agarose 2% em Salina 0,9% NaCl

A solução salina de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% foi preparada pesando 0,9 g de NaCl (Synth) em 100 mL de água destilada. Em seguida, 2 g da *UltraPure*™ Agarose (Invitrogen) foi diluída em 100 mL da solução salina. A solução foi aquecida em micro-ondas de 10 s em 10 s, até ficar totalmente homogênea.

4.4.2.3 Preparo do molde de agarose

A solução de agarose 2% em salina 0,9% NaCl foi completamente derretida em micro-ondas. Em uma placa estéril de 12 poços foi colocado o molde (Sigma) e foi pipetado 600 µL da solução de agarose e aguardou-se cerca de 10 min até solidificar. Posteriormente o molde foi desinformado com o auxílio de uma pinça estéril. O molde foi fixado no poço adicionando-se 700 µL da solução de agarose em torno do molde. Os moldes foram esterilizados por UV a 30 min.

Depois de esterilizados os moldes são equilibrados com o meio de cultura base DMEM (1,5 mL/poço da placa de 12 poços) e incubados na estufa a 5% CO₂ a 37 °C por 15 min ou mais. O meio de cultivo foi removido e adicionado novamente para equilibrar mais uma vez.

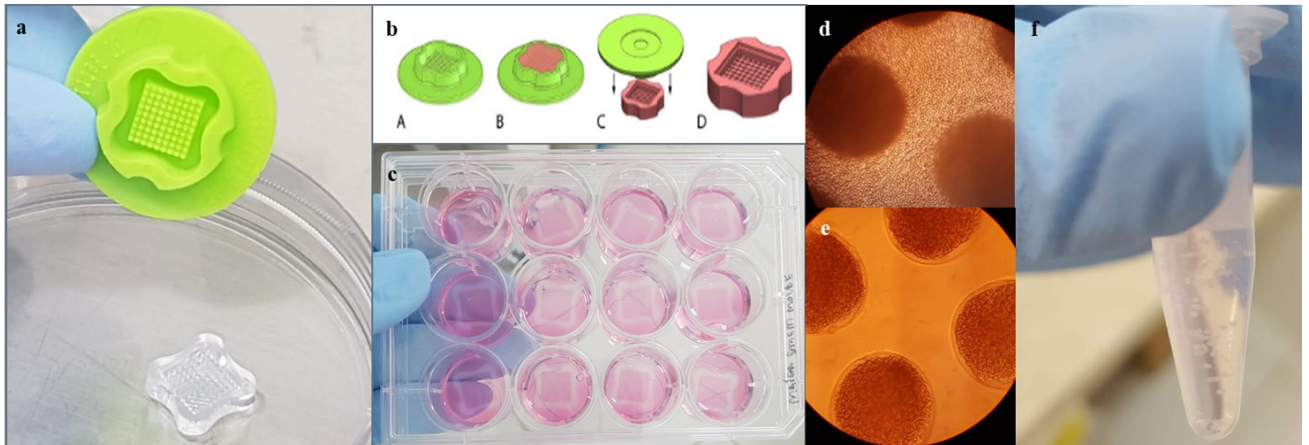
4.4.2.4 Produção dos esferoides

As células de SK-MEL-28 cultivadas em placas de cultura de tecidos atingiram a confluência de 80% formando uma monocamada de células. A monocamada de células foi tripsinizada, usando 1mL de Tripsina (Gibco®) e a suspensão de células foi quantificada com o uso da câmara de Neubauer (SP LABOR). As células (1×10^6 células SK-MEL-28) foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em 120 μ L de meio DMEM (para molde de 81 ressecções). Os moldes foram colocados na estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após 3 h foram adicionados 1 mL de meio DMEM em cada poço com molde e 1×10^6 células e novamente colocadas na estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. O meio DMEM foi trocado a cada 24 h, até completar 48 h. Na figura 10 pode-se observar todas as etapas de produção dos esferoides de SK-MEL-28.

4.4.2.5 Remoção dos esferoides

Os esferoides foram produzidos e retirados do micromolde através de jatos com 1 mL de PBS (Gibco®) colocados em *ependorfs* de 1,5 mL. Os esferoides decantaram no fundo dos *ependorfs* e dessa forma, o PBS foi removido.

Figura 10 - Produção do molde de agarose e de esferoides de SK-MEL-28.



a) Formação do molde de agarose; b) Etapas para a formação do molde de agarose; c) Moldes de agarose na placa de 12 poços com meio DMEM; d) células semeadas no molde de agarose; e) organização celular após 3 h no molde de esferoide; f) esferoide formados e tirados do molde.

Fonte: Autora (2019).

4.4.2.6 Viabilidade Celular dos Esferoides

A atividade metabólica celular dos esferoides foi avaliada pelo ensaio de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] (Promega) e foi realizado em três tempos: 24 h, 48 h e 72 h após as células de SK-MEL-28 serem plaqueadas nos moldes de agarose. Os esferoides foram removidos do molde e adicionados três em cada poço de uma placa de 96 poços e 100 µL de meio de cultura DMEM e 20 µL do reagente MTS foram colocados em cada poço. Os esferoides foram mantidos em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e a temperatura de 37°C por 2 h. Logo, os poços foram homogeneizados e transferidos 100 µL da solução para um novo poço de outra placa de 96 poços e assim foi realizada a leitura de absorbância. As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

4.4.2.6.1 Live/Dead

Os esferoides foram removidos com jatos de PBS após três tempos de cultivo: 1, 2 e 3 dias e colocados em *eppendorfs*. O PBS foi removido e foi adicionado nos esferoides 500 µL de meio incompleto mais 100 µL da solução de PBS, ethidium homodimer-1 e calceína (Invitrogen), deixando agir por 45 min. Em seguida os esferoides foram visualizados em Microscópio Confocal Leica DMI 6000 B no LCME - UFSC.

4.4.2.7 Morfologia dos esferoides

4.4.2.7.1 Microscopia em campo claro

Os esferoides foram fixados com uma solução de paraformaldeído 4% por 12 h nos três diferentes tempos de formação: 24 h, 48 h e 72 h. Os esferoides foram então lavados com PBS três vezes consecutivas e mantidos em geladeira a 4 °C, imersos em PBS, até o dia em que as imagens foram feitas. As imagens foram capturadas com o auxílio de um Microscópio Olympus BX41 no LAMEB – UFSC.

4.4.3 Cultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 nas superfícies da BNC e BNC-COL

A fim de escolher o melhor material e superfície para adesão e morfologia celular para ambas as células, as HUVECs foram cultivadas na superfície superior e inferior da BNC

e da BNC-COL na densidade de 100.000 células/ membrana de BNC de 24 poços. Após 4 h foi adicionado 500 µL de meio RPMI. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 3 dias e o meio foi trocado a cada 48 h. Os esferoides de SK-MEL-28 foram semeados na superfície superior e inferior da BNC e da BNC-COL na densidade de 50 esferoides/membrana de BNC de 24 poços. Após 6 h, 500µL do meio DMEM foi adicionado e o meio foi trocado a cada 48 h. Os esferoides foram mantidos a 37 °C e 5% de CO₂ por 3 dias.

Com o propósito de avaliar o comportamento e a morfologia das células e dos esferoides em ambos materiais e suas superfícies, as HUVECs foram fixadas em 4% de paraformaldeído por 30 min a temperatura ambiente e os esferoides de SK-MEL-28 foram fixados em 4% de paraformaldeído por 12 h a temperatura ambiente. Após a fixação, as membranas com as células e os esferoides foram lavadas três vezes com PBS e mantidos em geladeira a 4 °C, imersos em PBS, até o dia da realização das imagens. As imagens de campo claro foram tiradas utilizando um Microscópio Olympus IX83 no LAMEB – UFSC.

4.4.4 Cocultivo de HUVEC e esferoides de SK-MEL-28 em BNC-COL lado inferior

As HUVECs foram cocultivadas com esferoides de SK-MEL-28 na BNC-COL lado inferior em três condições diferentes, a fim de determinar a melhor condição entre elas, sendo:

Condição 1 –HUVECs foram cocultivadas simultaneamente com esferoides de SK-MEL na densidade de $5,2 \times 10^4$ HUVECs/cm² e 28 esferoides de SK-MEL-28/cm², respectivamente.

Condição 2 – HUVECs foram cultivadas na densidade de $5,2 \times 10^4$ HUVECs/cm² por 24 h. Após 24 h foram inseridos os esferoides na densidade de 28 esferoides de SK-MEL-28/cm².

Condição 3 – primeiramente foram cultivados os esferoides de SK-MEL-28 por 24 h na densidade de 28 esferoides de SK-MEL-28/cm², após esse período foram adicionadas as HUVECs na densidade de $5,2 \times 10^4$ HUVECs/cm².

Todas as condições foram armazenadas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 3 dias com 500 µL de meio DMEM por poço (placa de 24 poços), sendo o meio trocado a cada 48 h.

Após as amostras foram fixadas com 4% de paraformaldeído e depois lavadas três vezes em PBS e mantidas imersas em PBS na geladeira a 4°C. As imagens de campo claro foram feitas, conforme foi descrito anteriormente na seção 4.4.3, em Microscópio Olympus IX83 no LAMEB – UFSC. Essas imagens foram analisadas com o auxílio do software *WimSprout* (Wimasis Image Analysis).

As HUVECs e os esferoides de SK-MEL-28 foram também analisados morfológicamente nas três condições por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. As amostras foram lavadas três vezes com PBS e em seguida fixadas com paraformaldeído a 4%. Para visualizar os filamentos de F-actina, as células e os esferoides foram corados com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (Invitrogen). Os núcleos das células foram corados com DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) (Invitrogen). As amostras foram analisadas em Microscópio Confocal Leica DMI 6000 B no LCME - UFSC.

4.4.5 Ensaio de Invasão de Esferoides Tumorais

As HUVECs foram cultivadas no lado inferior das membranas de BNC-COL por 24 h na densidade de $5,2 \times 10^4$ células de HUVEC/cm². Depois de 24 h foram adicionados os esferoides na densidade de 28 esferoides de SK-MEL-28/cm². O cocultivo foi realizado por 7 dias, sendo avaliados os tempos de cultivo 1, 3 e 7 dias. As HUVECs e os esferoides de SK-MEL foram fixados com paraformaldeído 4% e as imagens foram feitas em campo claro em Microscópio Olympus IX83 no LAMEB – UFSC, conforme descrito anteriormente e analisadas através do software WimSprout.

Após, as amostras foram coradas com o corante Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina e DAPI, da mesma forma que foi exposto na seção anterior. As células foram visualizadas em Microscópio Confocal Leica DMI 6000 B no LCME - UFSC).

4.4.6 Avaliação da atividade citotóxica da DOX em diferentes modelos de culturas celulares: SK-MEL-28 (2D), esferoides de SK-MEL-28 (3D) e cocultivo de esferoides de SK-MEL-28 e HUVECs em BNC-COL (3D)

A citotoxicidade da doxorrubicina (DOX) (Sigma) nos três modelos, foi avaliada conforme adaptação do protocolo de Barros e colaboradores (2018) (BARROS et al., 2018). As células de SK-MEL-28 foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/ poço de 96 poços. Após 24 h, as células foram incubadas com DOX em três concentrações diferentes (25 µM, 50 µM e 100 µM) por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Foram utilizadas como controle negativo as células cultivadas sem DOX. Decorrida as 24 h, a atividade metabólica foi determinada por MTS, método descrito na seção 4.4.2.6.

Já o modelo 3D de esferoides foi realizado da seguinte maneira: os esferoides com densidade média de 12.000 células foram removidos após 48 h de cultivo em molde de agarose e foram colocados 9 esferoides por poço da placa de 96, ou seja, uma densidade de 28 esferoides/cm². Os esferoides foram semeados nos poços da placa com as mesmas três concentrações de DOX (25 µM, 50µM e 100 µM). Os esferoides não tratados com DOX foram usados como controle negativo. Após 24 h de cultivo dos esferoides com DOX, foi realizado o MTS.

No modelo de melanoma 3D, os esferoides de SK-MEL-28 e as HUVECs foram cultivados por 7 dias na densidade de 50 esferoides/ membrana de BNC-COL (24 poços) e 100.000 HUVECs/ membrana de BNC-COL (24 poços), respectivamente. Após o sétimo dia de cultivo foi adicionado no meio de cultura as três diferentes concentrações de DOX (25 µM, 50 µM e 100 µM). Como controle foi utilizado o cocultivo sem adição de DOX no meio de cultura. Depois de 24 h foi analisada a viabilidade das células através do ensaio de MTS.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através do software Origin[®], versão 8.0. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão da média e comparados pela análise de variância univariada (*one-way* ANOVA) e pelo teste Tukey, que considera os valores significativos estatisticamente quando $p < 0,05$.

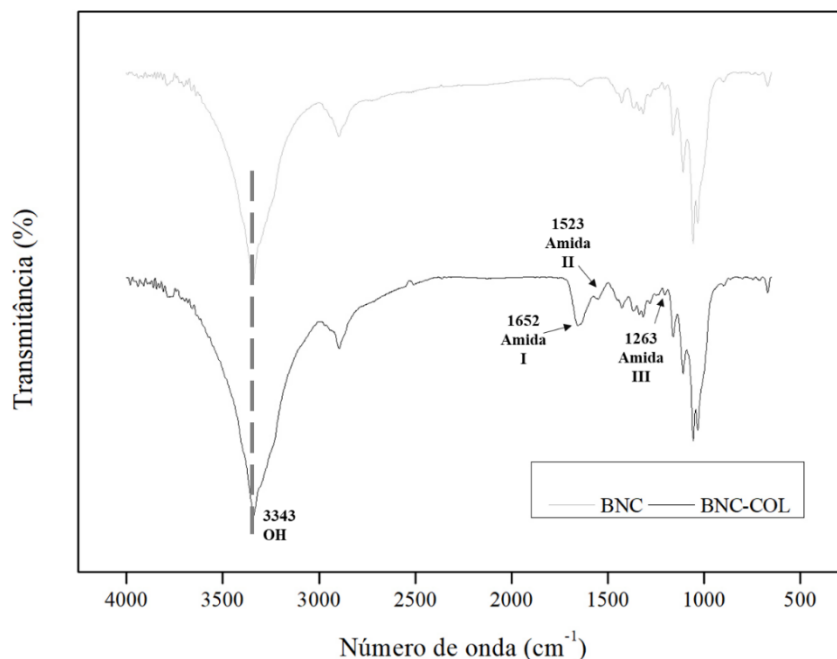
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BNC

A BNC foi oxidada para converter os grupos de hidroxila livres do carbono C₆ em grupos carboxilas através da adição de HNO₃/H₃PO₄-NaNO₂ resultando na BNC oxidada (BNC-ox) no carbono C₆. Esses grupos carboxilas foram ativados com EDC (agente de ligação) permitindo a ligação entre os grupos carboxilas ativos da BNC-ox com os grupos amina do colágeno I, resultando na imobilização covalente do colágeno I (BNC-COL).

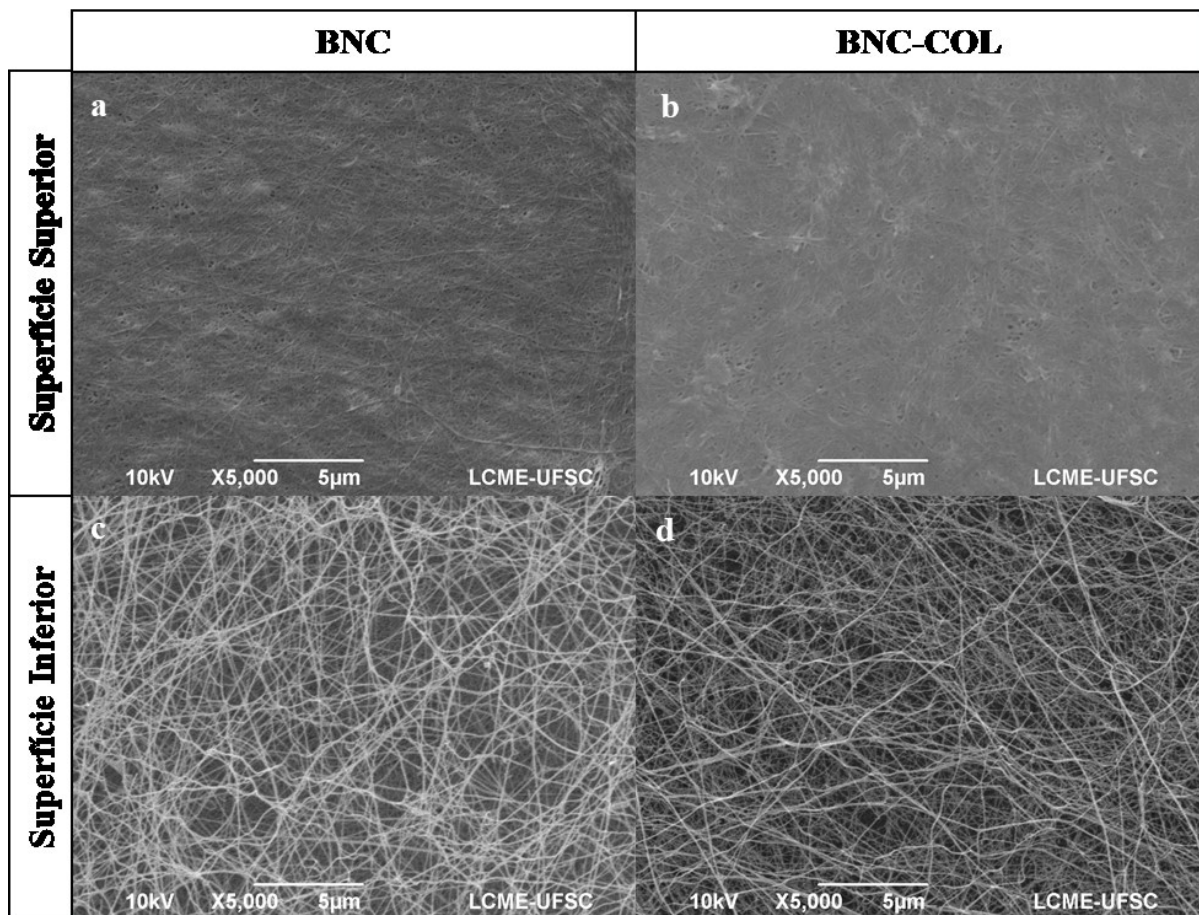
Os espectros de FTIR confirmaram a presença do colágeno na BNC-COL (Figura 11). As bandas características da BNC apresentaram-se em 3345 cm⁻¹ e 2898 cm⁻¹, sendo essas bandas conferidas aos grupos hidroxila e ligações carbono oxigênio em 1040 cm⁻¹ (COLLA, 2018; DOS REIS, 2016). A BNC-COL exibiu picos em 1658, 1554 e 1240 cm⁻¹, características das bandas amida I, II e III do colágeno (MEYER; DOS REIS; PORTO, 2019; SIONKOWSKA et al., 2004).

Figura 11- Espectroscopia FTIR das membranas de BNC e BNC-COL.



A microestrutura da superfície superior e inferior dos hidrogéis de BNC e BNC-COL foi analisada por MEV. A superfície superior da BNC é formada no cultivo bacteriano na interface ar (BERTI, 2012). Essa superfície foi caracterizada por um emaranhado de nanofibras 3D dispostas de forma mais densa e compacta com menor porosidade (Figura 12 a), conforme foi observado em trabalhos anteriores (BERTI, 2012; DOS REIS, 2016). A superfície inferior da BNC é formada na interface líquida ou submersa no meio de cultura do cultivo bacteriano (BERTI, 2012). A superfície inferior da BNC foi definida por uma rede entrelaçadas de nanofibras 3D com poros interconectados (Figura 12 c). De acordo com o Klemm *et.al.* a superfície inferior é mais porosa do que a superfície superior (KLEMM et al., 2012).

Figura 12 - Micrografias da BNC e BNC-COL.



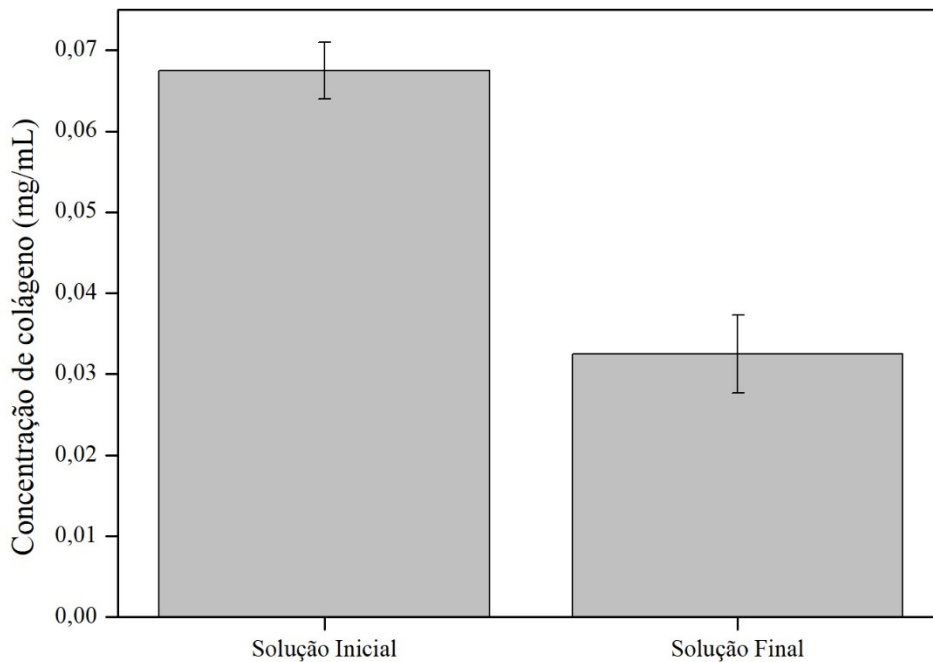
(a) Superfície superior da BNC, (b) Superfície superior da BNC-COL, (c) Superfície Inferior da BNC e (d) Superfície Inferior da BNC-COL.

Micrografias de MEV da superfície superior dos hidrogéis de BNC-COL evidenciaram que as nanofibras se mantiveram dispostas no mesmo arranjo observado na superfície superior dos hidrogéis de BNC (Figura 12 b). Na superfície inferior da BNC-COL as fibras também mantiveram sua estrutura, porém apresentam-se um pouco mais finas e algumas rompidas em função do processo de oxidação (Figura 12 d). As fibras da BNC após a oxidação se tornaram mais finas, porém a estrutura de rede 3D de nanofibras da BNC foi preservada na BNC-COL, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho (WEN et al., 2015). A imagem do MEV da superfície da BNC-COL mostra que o colágeno preencheu homogeneamente a estrutura da BNC (SASKA et al., 2012). Segundo Zhijiang *et al.* (2011) as moléculas de colágeno penetram nas nanofibras de BNC, não alterando assim a estrutura das nanofibras, que ainda podem ser visualizadas na superfície (ZHIJIANG, CAI; YANG, 2011).

5.1.1 Quantificação de colágeno imobilizado na BNC por Sirius red

A análise quantitativa de colágeno foi realizada usando o método de *Sirius red*. O ensaio colorimétrico de *Sirius red* é comumente usado para medir a quantidade de colágeno solúvel em soluções estoque (ANTOINE; VLACHOS; RYLANDER, 2014). Na Figura 13 encontram-se os resultados da análise, a concentração de colágeno na solução inicial, na qual as membranas de BNC-ox foram inseridas, foi de 0,06751 mg/mL e na solução final, o que restou de colágeno, foi obtida a concentração de 0,03245 mg/mL. Isso quer dizer que 0,03506 mg/mL, um pouco mais de 50% da concentração inicial do colágeno, ficou retida nas membranas, covalentemente ligada e por adsorção.

Figura 13 - Concentração de colágeno na solução inicial e final. Resultados expressos em mg/mL (média \pm desvio padrão, n=3).



A maioria dos biomateriais que imitam os tecidos *in vivo* são fabricados usando hidrogéis com baixo conteúdo de colágeno (4 mg/mL), sendo que a maioria das publicações utiliza entorno de 2 mg/mL. O uso dessas concentrações se deve a principalmente as formulações disponíveis comercialmente estarem em baixas concentrações (ANTOINE; VLACHOS; RYLANDER, 2014). Ramanujan et al. (2002) e Erikson et al. (2007) avaliaram diferentes concentrações de colágeno na difusividade e na estrutura da fibra e constataram uma diminuição na taxa de difusão e no comprimento e na organização da fibra com o aumento da concentração de colágeno (ERIKSON et al., 2007; RAMANUJAN et al., 2002).

Charoen et al. (2014) investigaram o efeito da variação da concentração de colágeno no gel de colágeno para o crescimento dos esferoides tumorais semeados, variando a concentração de colágeno entre 2 a 5 mg/mL. Eles verificaram que os esferoides de MDA-MB-231 exibiram um crescimento ideal nos géis com concentração de colágeno de 2 mg/mL (CHAROEN et al., 2014). Sapudom et al. (2015) observaram que o tamanho dos poros e o diâmetro das fibrilas das redes de colágeno I regulam a morfologia e a invasão das células

cancerígenas (SAPUDOM et al., 2015). Portanto, o uso de pequenas concentrações de colágeno I demonstraram influenciar no comportamento das células cancerígenas, fundamentando assim a imobilização de colágeno I nas membranas de BNC.

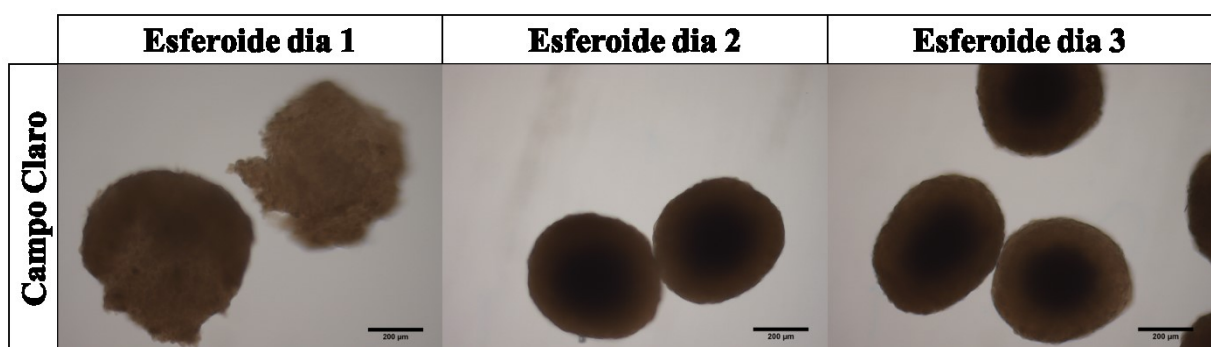
5.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ESFEROIDES

Os esferoides foram produzidos conforme o método desenvolvido e descrito na seção 4.4.2.4. Os esferoides foram removidos dos moldes após três tempos de formação: 1, 2 e 3 dias, e avaliados em termos de viabilidade celular e morfologia.

A morfologia dos esferoides nos três tempos de formação é mostrada na Figura 14. Pode-se notar que no primeiro dia de formação, os esferoides não estão bem formados, sua estrutura ainda não está completamente arredondada e por isso apresenta uma borda irregular. No segundo dia eles apresentam uma estrutura mais definida, homogênea e regular, assim como, no terceiro dia, os esferoides estavam bem formados e estabelecidos.

Gitschier *et al.* (2017) obtiveram resultados semelhantes, esferoides com 24 h de formação tinham suas bordas pouco definidas. Após 48 h de formação foi observado que o esferoide estava mais compactado e com bordas definidas. E com 80 h o centro do esferoide mostrava sinais iniciais de necrose (GITSCHIER; FANG; EGLIN, 2017).

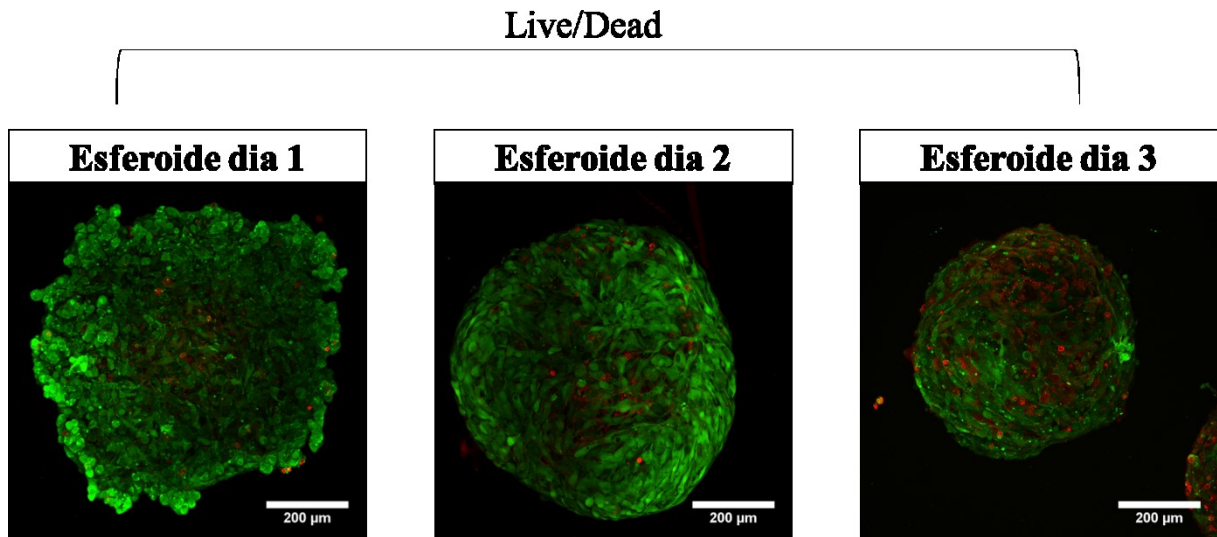
Figura 14 - Morfologia dos esferoides nos três tempos de formação em microscopia de campo claro.



A Figura 15 exibe os resultados do ensaio de *Live/Dead* nos três dias de formação e corrobora com os resultados da microscopia em campo claro. No dia 1 o esferoide apresenta formato irregular e pouca presença de células mortas (vermelho). Já no segundo dia de cultivo

é possível perceber uma estrutura mais definida e com maior presença de células mortas, principalmente no núcleo do esferoide. O terceiro dia de cultivo apresenta um esferoide mais compactado, evidenciando seu núcleo apoptótico. A localização de células mortas dentro do núcleo do tumor pode ser atribuída ao transporte restrito de nutrientes para o núcleo, como acontece também *in vivo* (LAMICHHANE et al., 2016).

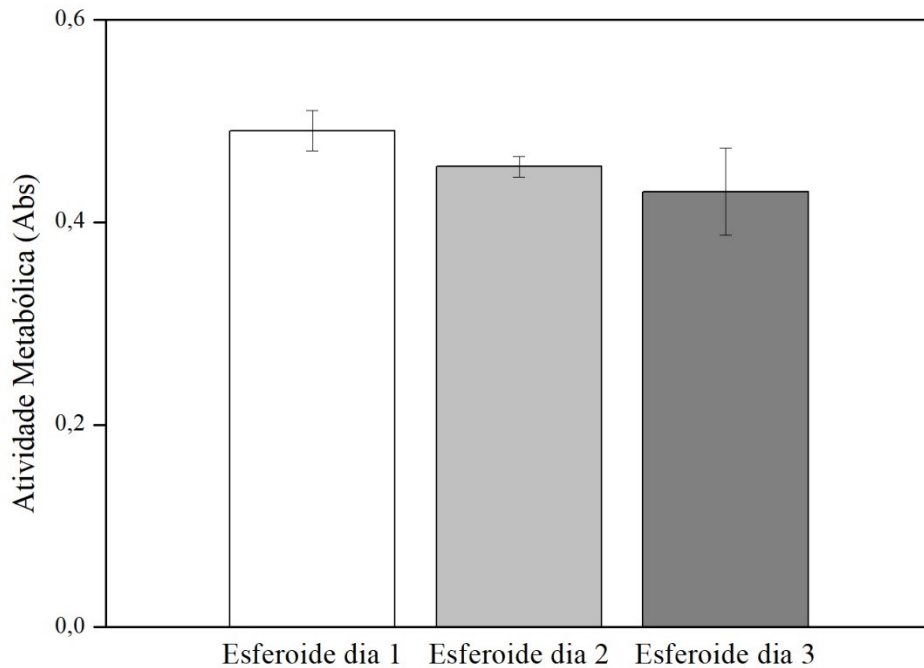
Figura 15 – Ensaio de Live/Dead nos esferoides nos três tempos de formação.



Segundo Zaroni *et al.*, o crescimento dos esferoides acontece de forma semelhante aos tumores sólidos, inicia-se com um aumento do volume seguido de uma esferoidização, onde os esferoides se tornam mais regulares e diminuem seu volume até atingirem um equilíbrio, sendo essa uma fase indispensável para a organização estrutural e funcional complexa do esferoide (ZANONI et al., 2019).

A viabilidade celular nos três dias de formação foi determinada quantitativamente pelo ensaio de MTS, o resultado pode ser visualizado no gráfico abaixo (Figura 16).

Figura 16 – Atividade metabólica no primeiro, segundo e terceiro dia de formação do esferoide, através do método de MTS. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.



Os resultados demonstraram que não há diferença significativa na atividade metabólica celular no decorrer dos três dias de formação do esferoide, ou seja, apesar de exibir diferenças morfológicas e estruturais, os esferoides possuem a mesma atividade metabólica. No terceiro de formação do esferoide é possível que haja menos células viáveis, porém elas estão metabolicamente mais ativas. Por isso, nesse trabalho foi proposto o uso de esferoides com 2 dias de formação, visto que no segundo dia sua estrutura já apresenta uma boa formação com bordas regulares e definidas e sua atividade metabólica é a mesma encontrada nos demais dias de formação.

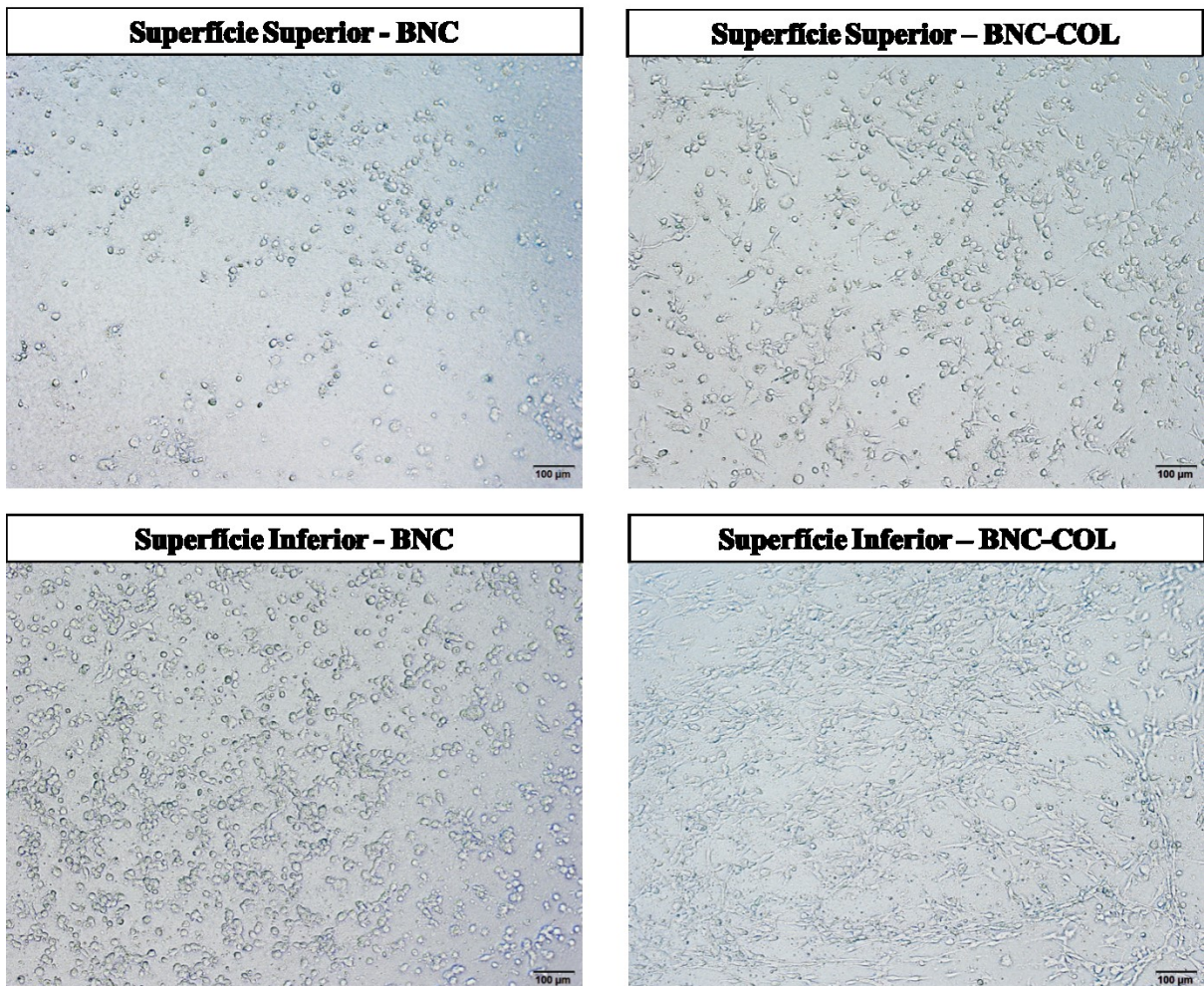
5.3 CULTIVO DE HUVECS E ESFEROIDES DE SK-MEL-28 NAS SUPERFÍCIES DA BNC E BNC-COL

As HUVECs foram cultivadas nas superfícies superiores e inferiores da BNC e da BNC-COL e através da microscopia em campo claro obtiveram-se os resultados mostrados na

Figura 17. Corroborando com os resultados de Berti *et al.* (2013) observou-se que houve na superfície superior da BNC pouca adesão celular e as células estavam menos espreiadas e mais arredondadas. Já no lado inferior percebeu-se um comportamento mais aderente, ou seja, maior aderência das HUVECs. Isto pode estar associado à porosidade, visto que o arranjo da rede de fibras, ou a densidade, pode ser um fator responsável pelo comportamento diferente da HUVEC em ambos os lados da membrana de BNC (BERTI et al., 2013).

Figura 17 - Cultivo de HUVECs em meio de cultivo RPMI durante 3 dias nas superfícies superiores e inferiores da BNC e BNC-COL.

HUVECs



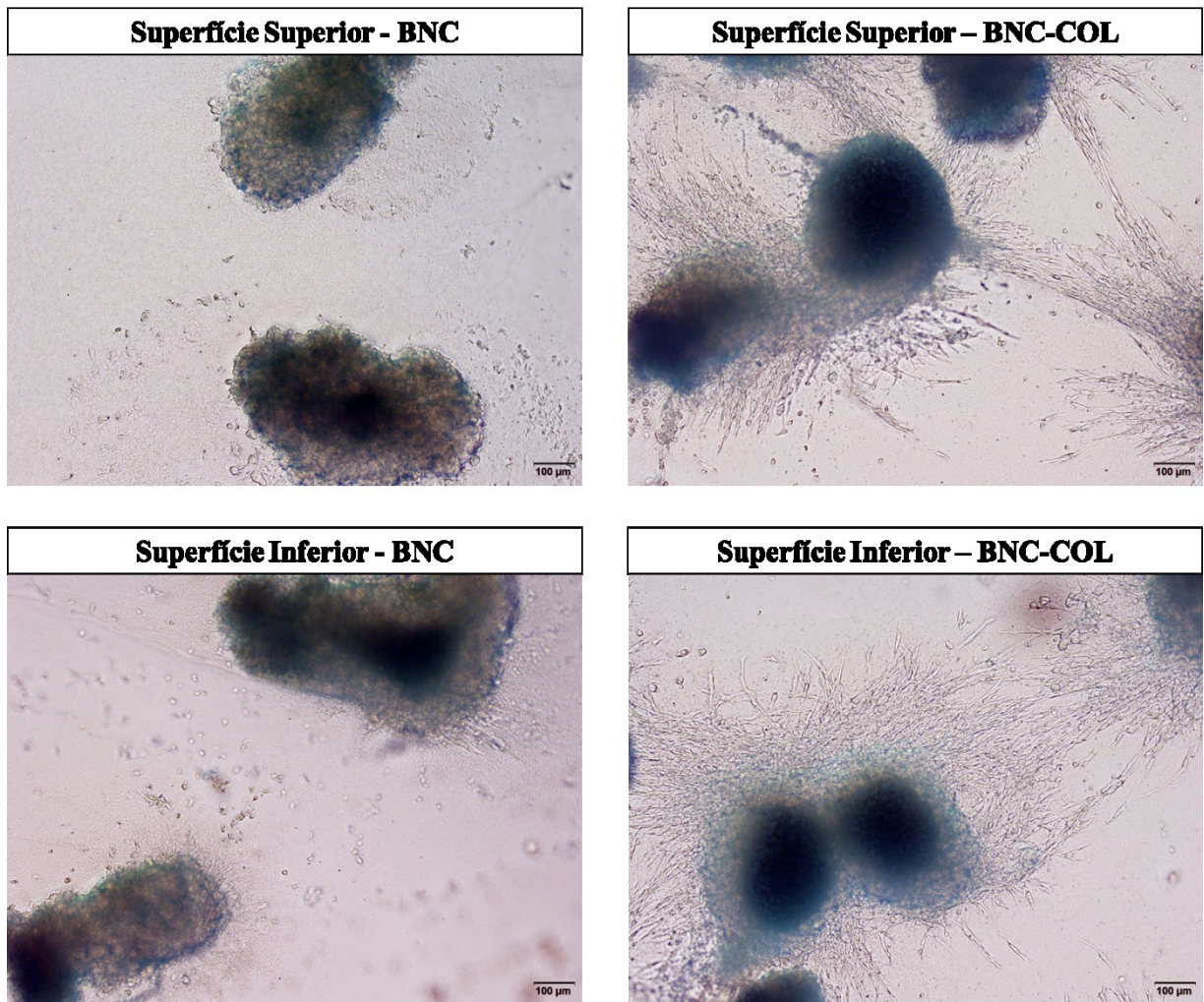
Quando as HUVECs foram cultivadas na BNC-COL ocorreu um comportamento diferenciado, com maior adesão em ambos os lados e principalmente no lado inferior, onde foi possível notar células mais espalhadas e aderidas evidenciando um comportamento celular diferente das demais superfícies. Este resultado corrobora com o trabalho de Solouk *et al.* (2011) que constatou que a imobilização de colágeno era benéfica para a fixação de células endoteliais, em comparação com materiais onde a superfície não possuía revestimento de colágeno (SOLOUK *et al.*, 2011). Blacher *et al.* (2014) verificou que células epiteliais quando cultivadas em géis de colágeno adotavam diferentes modos de invasão (BLACHER *et al.*, 2014).

Em outro trabalho, Nguyen *et al.* (2017) constatou que ao cultivar células HUVECs e hMSCs em *scaffolds* de alginato e colágeno *in vitro*, elas tiveram um comportamento similar ao encontrado *in vivo*. Quando as células foram semeadas em discos planos de hidrogéis de alginato, os hMSCs permaneceram com a morfologia arredondada e pouca adesão, o mesmo ocorreu com as HUVECs. Por outro lado, um número maior de células ficou aderido aos hidrogéis de colágeno, tanto para hMSCs quanto para HUVECs, com um número maior de HUVECs com morfologia alongada (NGUYEN *et al.*, 2017).

Concomitante ao cultivo das HUVECs nas membranas de BNC e BNC-COL, os esferoides de SK-MEL-28 também foram cultivados nas superfícies superiores e inferiores dos hidrogéis de BNC e BNC-COL. Os resultados podem ser visualizados a seguir na Figura 18.

Figura 18 - Cultivo de esferoides de SK-MEL-28 em meio de cultivo DMEM durante 3 dias nas superfícies superiores e inferiores da BNC e BNC-COL.

Esferoides de SK-MEL-28



Os esferoides de SK-MEL-28 cultivados durante 3 dias nas diferentes superfícies da BNC, em sua grande maioria, não conseguiram aderir na superfície superior da BNC, porém os poucos que aderiram não migraram para a superfície da membrana. No lado inferior da BNC, os esferoides também aderiram em menor quantidade, mas foi possível ver uma pequena migração de células de SK-MEL-28 migrando do esferoide para a superfície da BNC.

Na membrana de BNC-COL os esferoides de SK-MEL-28 apresentaram maior adesão e migração celular tanto na superfície superior quanto na superfície inferior e dessa forma, os esferoides revelaram um caráter mais invasivo, visto que a adesão entre o colágeno (COL I e COL IV) e as células cancerígenas afeta a progressão do câncer (XU et al., 2019).

Assim, para prosseguimento do trabalho foi escolhido o hidrogel BNC-COL lado inferior, pois apresentou melhores resultados visíveis para ambas as células, HUVECs e esferoides de SK-MEL-28, quando cultivados durante 3 dias.

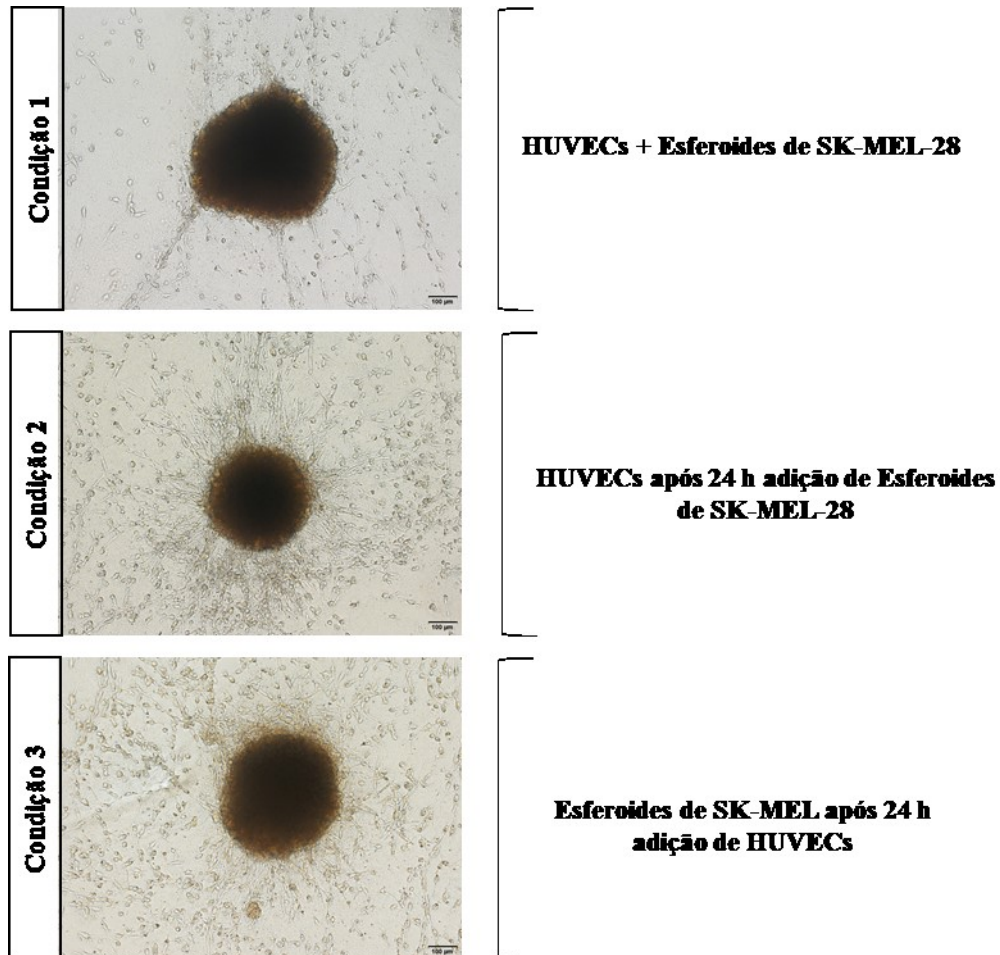
5.4 COCULTIVO DE HUVEC E ESFEROIDES DE SK-MEL-28 EM SUPERFÍCIE INFERIOR DA BNC-COL

A fim de avaliar a melhor condição de cocultivo das células HUVECs e dos esferoides de SK-MEL-28, eles foram semeados nas condições seguintes:

- 1) HUVECs + esferoides de SK-MEL-28;
- 2) HUVECs + esferoides de SK-MEL-28 após 24h;
- 3) Esferoides de SK-MEL-28 + HUVECs após 24h.

A Figura 19 mostra os resultados obtidos nas 3 condições de cultivo. Como se pode observar na condição 1, quando ambas são cultivadas ao mesmo tempo, os esferoides mostraram menor migração quando comparados com as outras condições e as HUVECs tiveram menor adesão e morfologia menos espreada, isso pode estar relacionado a adaptação das células, já que ambas foram adicionadas ao mesmo tempo na membrana de BNC-COL.

Figura 19 - Cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 na superfície inferior da BNC-COL.



Na condição 2 como as HUVECs foram cultivadas primeiro, permitindo que as HUVECs se adequem ao ambiente e estabeleçam interação com o biomaterial antes da adição dos esferoides de SK-MEL-28. Nessa condição é possível visualizar a migração das células de melanoma saindo do esferoide e uma provável interação entre elas.

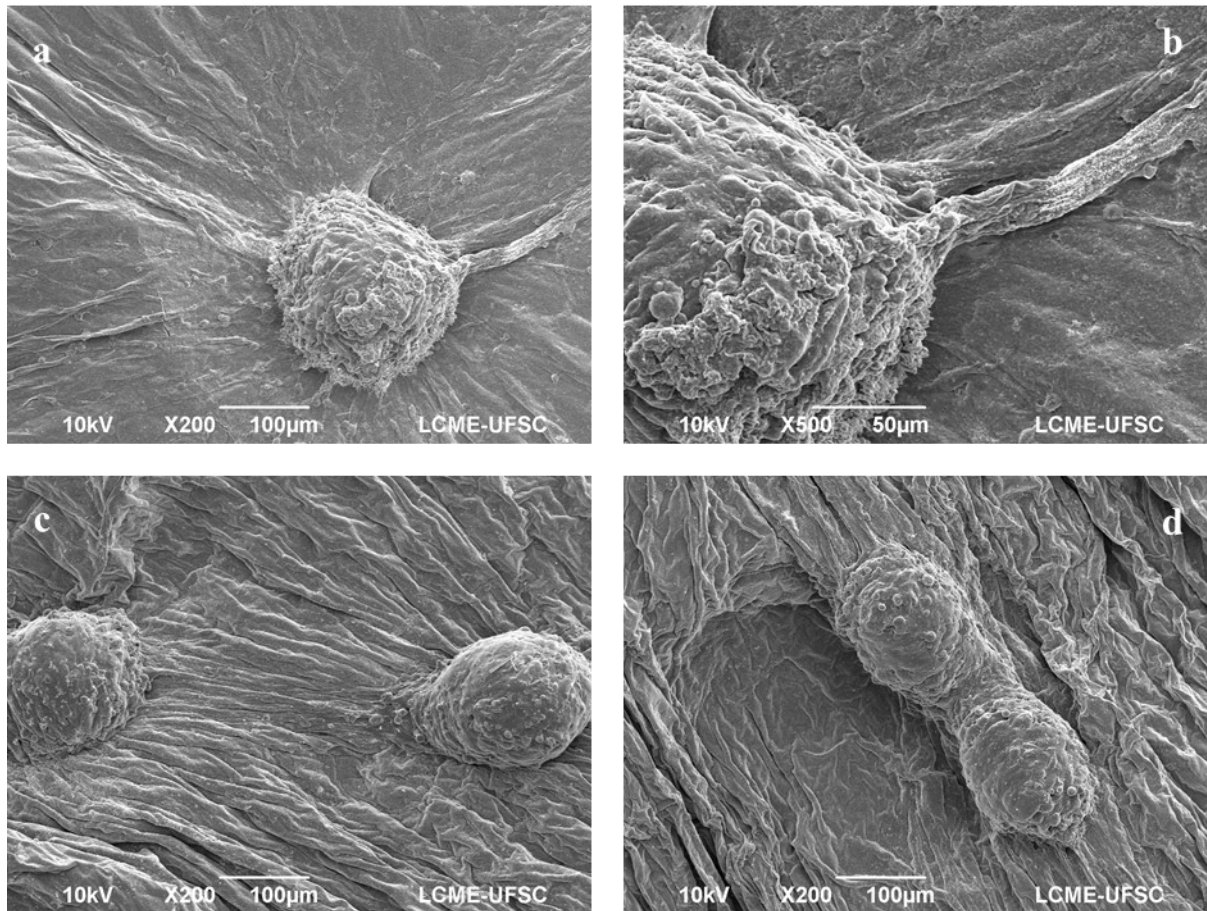
A condição de cultivar primeiramente as células endoteliais e após adicionar as células tumorais é a utilizada em modelos de cocultivo. De acordo com Benton *et al.* (2014), as células tumorais parecem migrar em direção as células endoteliais, quando foram cultivadas com esferoides de MDA-MB-231 em uma matriz de colágeno I já contendo tubos formados por HUVECs (BENTON *et al.*, 2014).

Na condição 3 os esferoides foram semeados primeiramente e com isso aderiram e migraram antes das HUVECs serem cultivadas. Após a inserção das HUVECs, os esferoides mantiveram seu comportamento e as HUVECs apresentaram sua morfologia espalhada.

Shoval *et al.* (2017) constatou que células de melanoma (A375) são altamente invasivas quando cultivadas no colágeno. Aliás, eles desenvolveram heteroesferoides com células de HUVEC e diferentes células tumorais, como células de melanoma (A375), células de tumor pancreático (PANC1 e BxPC3) e células de câncer de mama (MDA-MB-231) e observaram que com maior concentração de HUVEC no tumor, os esferoides produzem margens mais irregulares à medida que as células “brotam” ou se desprendem do agregado central, sugerindo um maior potencial de invasão (SHOVAL *et al.*, 2017). Portanto, o cocultivo de esferoides tumorais e HUVECs favorece o fenótipo invasivo, contribuindo com a capacidade de invasão do tumor.

Nas imagens de micrografias da condição 2 de cultivo (Figura 20) foram possíveis confirmar a migração celular a partir do esferoide, a comunicação celular entre os esferoides e a formação de MEC pelo cocultivo de células de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28.

Figura 20 - Micrografias do cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 no terceiro dia de cocultivo.

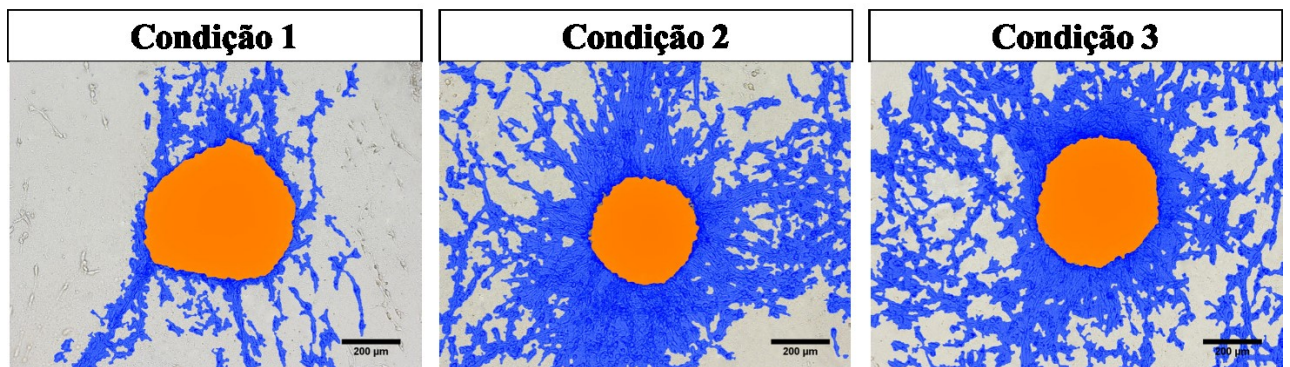


(a) Esferoide de SK-MEL-28 com migração celular em aumento de 200x, (b) Esferoide de SK-MEL-28 com migração celular em aumento de 500x, (c) Esferoides de SK-MEL-28 com células migrando em direção ao outro esferoide, (d) A união dos esferoides de SK-MEL-28.

Os esferoides incorporados em *scaffolds* possuem duas populações, uma migratória ou invasiva e um núcleo não migratório. Esses dois comportamentos celulares são facilmente encontrados nos esferoides de melanoma, glioma e mama (CISNEROS CASTILLO et al., 2016; TEVIS et al., 2016; VÖRSMANN et al., 2013). As interações célula-MEC dominam a população invasora e os contatos célula-célula dominam o núcleo não migratório (TEVIS; COLSON; GRINSTAFF, 2017). Na Figura 21 observa-se esse comportamento migratório relatado nas três condições de cocultivo, principalmente nas condições 2 e 3, em que se

cultiva primeiro um tipo celular, HUVECs e esferoides de SK-MEL-28, respectivamente e após 24 h adiciona-se o outro tipo celular, esferoides de SK-MEL-28 e HUVECs.

Figura 21 - Imagens em campo claro dos esferoides na condição 1 (HUVECs + esferoides de SK-MEL-28), na condição 2 (HUVECs e após 24 h adição de esferoides de SK-MEL-28) e na condição 3 (esferoides de SK-MEL-28 e após 24 h adição de HUVECs) de cocultivo na superfície inferior da BNC-COL analisadas pelo *software* Wimasis. Barra de escala representando 200 μm .



Essas imagens confirmam os resultados já discutidos anteriormente nessa seção, mostrando que há maior migração celular nas condições de cocultivo 2 e 3, em que um tipo celular é cultivado sozinho e se estabelece por 24 h e após esse período é inserido o outro tipo celular. Na Tabela 1 pode-se visualizar esses resultados através de valores quantificados pelo *software* Wimasis.

Tabela 1 - Resultados quantitativos da área do esferoide e invasão nas três condições de cocultivo em pixels (px).

Condição 1	236.709	572.215
Condição 3	184.216	1.236.363

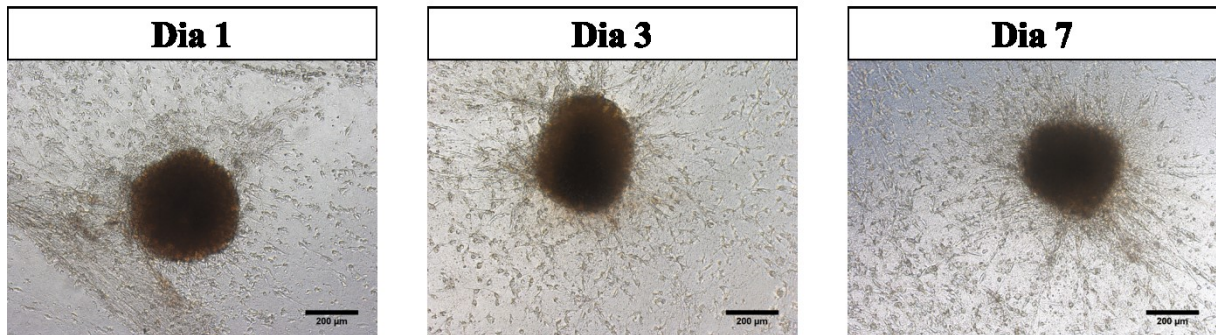
O modelo de esferoide incorporado em *scaffolds* é frequentemente mencionado como o ensaio de invasão de esferoides, destacando a utilidade desse modelo no estudo de mecanismos de invasão de células cancerígenas na MEC (TEVIS; COLSON; GRINSTAFF, 2017).

5.5 INVASÃO TUMORAL EM DIFERENTES TEMPOS DE COCULTIVO (HUVECS + ESFEROIDES DE SK-MEL-28)

O cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 foi realizado em três tempos diferentes: 1, 3 e 7 dias, a fim de acompanhar a migração celular e a invasão das células tumorais no decorrer dos dias (Figura 22). De acordo com Goertzen *et al.* (2018), os esferoides fornecem um bom modelo para estudar a invasão tumoral em matrizes 3D baseadas em colágeno, pois utiliza um esferoide tumoral cercado por uma matriz extracelular imitando o ambiente 3D nativo do corpo humano (GOERTZEN; EYMAEL; MAGALHAES, 2018).

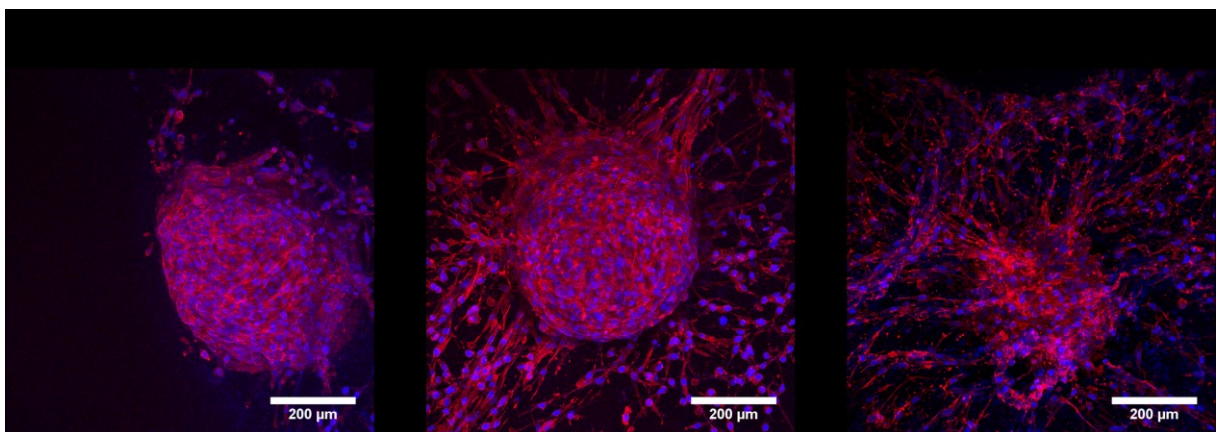
Com o passar dos dias, pode-se constatar que há uma maior migração das células de SK-MEL-28 do esferoide que se espriam pela membrana de BNC-COL. As células cancerígenas invadem a matriz à medida que migram a partir do esferoide e se estendem para um ambiente extracelular semelhante a MEC (VINCI; BOX; ECCLES, 2015).

Figura 22 - Imagens em campo claro do cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 na superfície inferior da BNC-COL nos dias 1, 3 e 7. Barras de escala representando 200 μm .



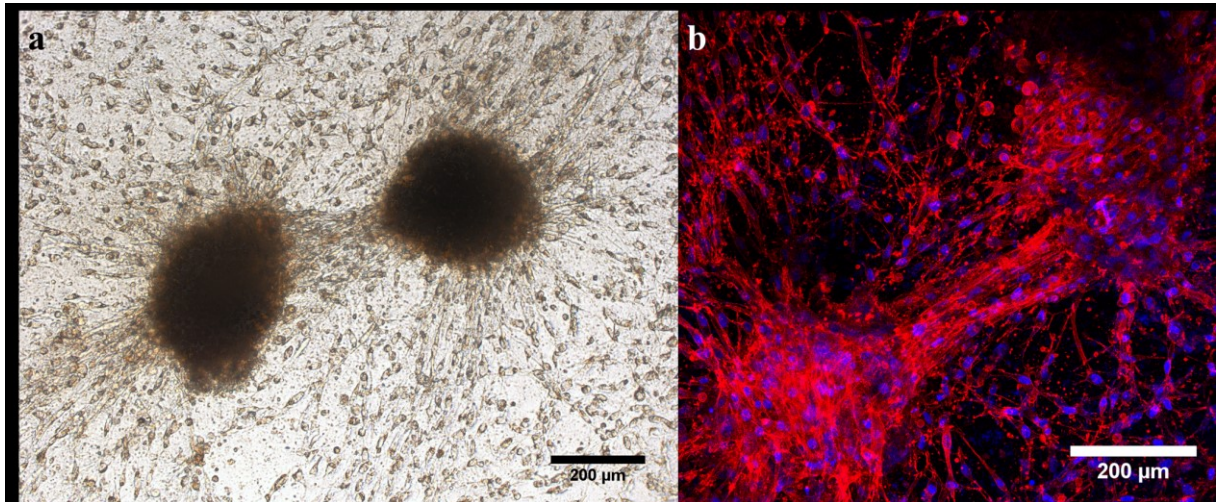
No primeiro dia nota-se a adesão do esferoide na membrana e um início de migração das células tumorais. No terceiro dia é possível observar as células migrando do esferoide em direção a membrana. E por fim, no sétimo dia pode-se evidenciar uma invasão celular mais estabelecida das células tumorais na MEC com o espraiamento das mesmas, conforme a Figura 23.

Figura 23 – Imagens de microscopia confocal do cocultivo de HUVECs e esferoides de SK-MEL-28 na superfície inferior da BNC-COL nos dias 1, 3 e 7. As células foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e DAPI (azul). Barras de escala representando 200 μm .



No sétimo dia também pode-se observar uma maior interação entre os esferoides, devido a migração das células de melanoma a partir do esferoides, como mostra a Figura 24.

Figura 24 – Migração celular a partir dos esferoides no sétimo dia de cocultivo.



(a) Imagem em campo claro dos esferoides no sétimo dia de cocultivo. (b) Imagens de microscopia confocal dos esferoides no sétimo dia de cocultivo. As células foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e DAPI (azul).

Vinci *et al.* (2015) utilizaram esferoides de células de glioblastoma (U-87 MG) para o ensaio invasão tumoral. Para isso eles cultivaram os esferoides de glioblastoma em matrigel e monitoraram e quantificaram até 72 h usando um citômetro de imagem e obtiveram um maior número de invasão em 72 h (VINCI; BOX; ECCLES, 2015).

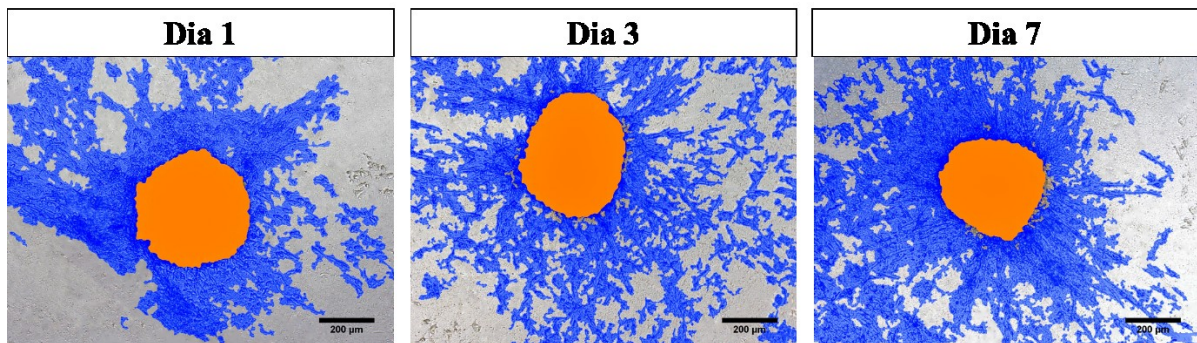
Células de câncer de mama (4T1 e E0771) demonstraram um alto grau de saída do esferoide e após 24 h de incorporação do esferoide na matriz 3D era possível perceber o início de invasão (BERENS *et al.*, 2015). Outro ponto destacado por Berens *et al.* (2015), foi que o tipo de matriz 3D pode influenciar diretamente no potencial de invasão, e matrizes que contem colágeno podem ter efeitos díspares na invasão das células (BERENS *et al.*, 2015).

A utilização de modelos de esferoides cultivados em matrizes 3D pode ter outras aplicações e abordar aspectos além da invasão de células tumorais, auxiliando na criação de uma complexidade extra adicionando células presentes no estroma tumoral, como fibroblastos, monócitos e células endoteliais no próprio esferoide ou na matriz circundante (VINCI; BOX; ECCLES, 2015; YUAN *et al.*, 2018).

O grau de invasão pode ser quantificado por citômetro de imagem ou usando um microscópio padrão em combinação com o software de imagem (VINCI; BOX; ECCLES, 2015). Portanto, através do software Wimasis (WimSprout) foi possível analisar e quantificar

a área do esferoide e da invasão tumoral, através da migração celular a partir dos esferoides nos dias 1, 3 e 7 (Figura 25).

Figura 25 - Imagens em campo claro de esferoides nos dias 1, 3 e 7 no cocultivo com HUVECs em superfície inferior da BNC-COL analisadas pelo *software* Wimasis. Barra de escala representando 200 μm .



Na Tabela 2 encontram-se os resultados quantitativos obtidos pelo *software* Wimasis. A área do esferoide foi diminuindo com o passar dos dias de cocultivo, sendo de 174.369 px no primeiro dia e 134.523 px no sétimo dia. No entanto, a área de invasão foi aumentando no decorrer dos dias, indicando que a migração celular a partir do esferoide continua a crescer e invadir o espaço com o passar dos dias.

Tabela 2 - Resultados quantitativos da área do esferoide e de invasão nos dias 1, 3 e 7 em pixels (px).

	Área do Esferoide (px)	Área de Invasão (px)
Dia 1	174.369	1.015.831
Dia 3	167.276	1.119.625
Dia 7	134.523	1.188.391

De acordo com Benton *et al.* (2014), o hidrogel fornece um suporte físico para as células aderirem e se moverem. Logo, as células se dissociam do esferoide e invadem o hidrogel, esse processo pode ser empregado para avaliar a eficácia de um fármaco para inibir a invasão celular em três dimensões (BENTON et al., 2014).

Dessa forma, a próxima etapa do trabalho foi testar a eficácia de um fármaco com atividade antitumoral já estabelecida perante o modelo tumoral invasivo, representado pelo sétimo dia de cocultura de esferoides de SK-MEL-28 e HUVECs na superfície inferior da BNC-COL.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA DOX EM DIFERENTES MODELOS DE CULTURAS CELULARES: SK-MEL-28 (2D), ESFEROIDES DE SK-MEL-28 (3D) E COCULTIVO DE ESFEROIDES DE SK-MEL-28 E HUVECS EM BNC-COL (3D)

A atividade citotóxica da DOX foi avaliada quantitativamente através da atividade metabólica pelo ensaio colorimétrico de MTS. Os modelos de células SK-MEL-28 em monocamada 2D, modelo esferoide 3D e o modelo de melanoma 3D foram expostos a três concentrações molares de DOX: 25 μM , 50 μM e 100 μM por 24 h. A Figura 26 mostra o efeito da DOX na atividade metabólica e a Tabela 3 os valores encontrados em cada um dos modelos testados.

Figura 26 - Atividade metabólica do modelo de monocamada 2D, modelo esferoide 3D e modelo de melanoma 3D quando em contato com as diferentes concentrações molares da DOX por 24 h, através do método de MTS. Valores expressos em média \pm desvio padrão, n=5.

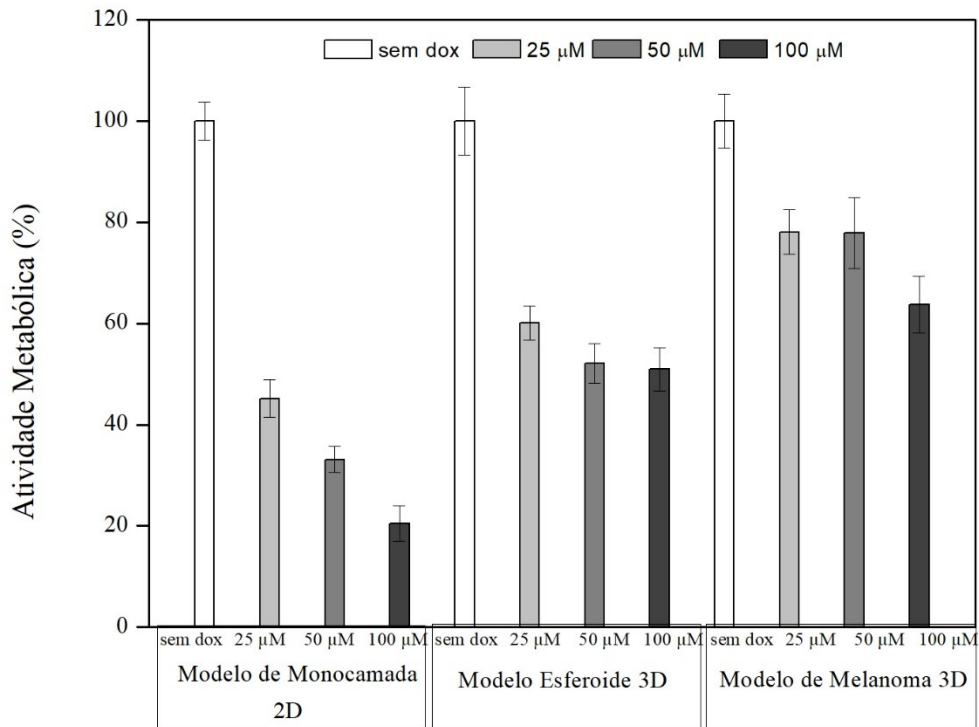


Tabela 3 - Resultados quantitativos da atividade metabólica do modelo de monocamada 2D, modelo esferoide 3D e modelo de melanoma 3D em diferentes concentrações molares de DOX.

	Modelo de Monocamada 2D	Modelo Esferoide 3D	Modelo de Melanoma 3D
Sem DOX	100 ± 3,8	100 ± 6,7	100 ± 5,2
25 µm	45 ± 3,7	60 ± 3,3	78 ± 4,3
50 µm	33 ± 2,5	52 ± 3,9	77 ± 6,9
100 µm	20 ± 3,4	50 ± 4,2	63 ± 5,5

O modelo de monocamada 2D apresentou uma grande redução na atividade metabólica, entorno de 80%, conforme foi aumentando a concentração molar de DOX, sendo que na maior concentração de 100 µM foi de 20,47%. Já na menor concentração de DOX, de

25 μM , houve um decréscimo de mais 50% na atividade metabólica, provando que o modelo de monocamada 2D é mais sensível a exposição a DOX. A cultura de monocamada 2D é muito empregada como modelo *in vitro* para investigar o comportamento do tumor e identificar terapias antitumorais eficazes, porém possui muitas limitações, como a falta de interações célula-MEC e os fenótipos malignos reduzidos das células cancerígenas (ZHANG et al., 2016). O cultivo 2D encontra dificuldades de mimetizar o que acontece *in vivo*. O crescimento em superfícies 2D promove um achatamento e remodelação celular no citoesqueleto da célula. Esse achatamento impacta a forma nuclear, levando a diferenças na expressão gênica e na síntese de proteínas. Logo, modelos 2D são ruins para estudar crescimento celular *in vitro*, pois são incapazes de formar estruturas semelhantes aos tecidos naturais. Isso afeta significativamente o desempenho celular e faz com que monocamadas de células sejam mais suscetíveis a agentes terapêuticos (KNIGHT; PRZYBORSKI, 2014).

O modelo esferoide 3D teve uma pequena diferença na atividade metabólica entre as três concentrações utilizadas de DOX, sendo que na menor concentração a atividade metabólica foi de 60% e na maior concentração chegou a 50%, ou seja, o modelo esferoide é mais resistente a DOX do que o modelo de monocamada 2D. Os modelos 3D possuem ligações extracelulares e elevada pressão de fluido intersticial, o que permite uma barreira física à difusão do medicamento, que não é refletida adequadamente na cultura de células 2D (ZHANG et al., 2016). Outra fator é a hipóxia que ocorre nos tumores sólidos e promove populações de células quiescentes, que alteram a capacidade de resposta dos tumores a medicamentos anticâncer e radioterapia (LAMICHHANE et al., 2016). Muitos fármacos quimioterápicos são mais eficazes em células em proliferação, permitindo que as células quiescentes no interior escapem do tratamento (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016).

Saleh (2017) comparou a concentração citotóxica para 50% (CC_{50}) da dacarbazina no modelo de monocultura celular 2D de B16F10 (melanoma murinho) com a CC_{50} com o modelo esferoide 3D e houve um aumento de três vezes nesse parâmetro, sendo o valor do modelo 2D de $870 \mu\text{M} \pm 70 \mu\text{M}$ e do modelo de esferoide de $2800 \mu\text{M} \pm 1000 \mu\text{M}$ (SALEH, 2017).

O modelo de melanoma 3D apresentou a atividade metabólica similar nas concentrações de 25 e 50 μM DOX, 78% e 77%, respectivamente. E a menor atividade metabólica constatada nesse modelo foi na concentração de 100 μM sendo de 63%. Assim,

mesmo dobrando a concentração de DOX a atividade metabólica manteve-se ou teve apenas um pequeno decréscimo.

A remodelação da MEC pelas células cancerígenas fornece a resistência mais simples, na forma de barreiras físicas que atrasam ou cancelam a entrega dos medicamentos, pois em muitos casos, essa entrega nos espaços intersticiais e em torno do tumor depende da difusão e da convecção acionada por pressão. De fato, a maioria das drogas anticâncer mostra penetração limitada em tumores sólidos (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016).

Para imitar melhor o microambiente dos tumores *in vivo*, as células tumorais devem ser cultivadas na presença de células estromais que também existem no nicho tumoral (SHOVAL et al., 2017). Os sistemas contendo células de suporte de tumor (TAM, CAF, EC entre outras) são úteis para o desenvolvimento de novas imunoterapias ou quimioterápicos direcionados contra elementos do estroma do tumor (TEVIS; COLSON; GRINSTAFF, 2017). A complexa interconexão entre células tumorais e células epiteliais contribui para as modificações no perfil de expressão gênica e seu estado de ativação, que iniciam a angiogênese contribuem para a resistência aos medicamentos (SHOVAL et al., 2017).

A concentração de 25 μM de DOX foi citotóxica para 55% das células do modelo de monocamada 2D, comparando com os demais modelos, pode-se compreender que essa citotoxicidade não foi a mesma, sendo citotóxica em 40% das células do modelo esferoide 3D e no modelo de melanoma 3D em apenas 22%. Por isso, salienta-se a importância de um bom modelo para o *screening* de drogas anticâncer, uma vez que alguns modelos podem apresentar resultados satisfatórios e eficientes de algumas drogas, mas em etapas posteriores essas drogas se mostram incapazes de combater as células cancerígenas.

Outro ponto que merece destaque é a diferença entre o modelo esferoide 3D muito empregado e o modelo de melanoma 3D. Apesar do modelo esferoide mimetizar melhor o microambiente tumoral do que o modelo 2D, ele possui limitações quando comparado com um modelo de esferoides cultivado em *scaffolds* com células pertencentes ao microambiente tumoral.

Como as interações entre células cancerígenas e MEC desempenham um papel importante na sobrevivência e no comportamento das células tumorais, as terapias direcionadas à MEC proporcionam uma abordagem promissora, seja na prevenção da quimiorresistência conferida pela MEC ou na alteração do ambiente extracelular, de forma que as terapias atuais possam superar os limites dos tratamentos (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016).

Quando a DOX for usada como agente antitumoral isolado, a dose inicial recomendada nos adultos é de 60-70 mg/m², a cada 3 semanas. E quando for usado em associação a outros agentes antitumorais, a dose deve ser reduzida para 25-50 mg/m², a cada 3 semanas (EUROFARMA, 2016). Se as concentrações molares de DOX forem convertidas em relação a área da placa temos as seguintes dosagens: 41 mg/m² (25 µM), 82 mg/m² (50 µM) e 164 mg/m² (100 µM). Portanto, as concentrações utilizadas nesse trabalho abrangem as doses utilizadas e até extrapola na maior concentração ultrapassando 2x a dose recomendada.

O modelo de melanoma 3D desenvolvido nesse trabalho demonstrou resultados satisfatórios quando comparado aos demais modelos testados, principalmente com relação a mimetizar o microambiente tumoral. Afinal, no modelo de melanoma 3D as interações célula-célula e célula-MEC foram favorecidas, impactando, assim, diretamente nos resultados obtidos quanto a eficácia do fármaco.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho foi possível desenvolver um protótipo de plataforma tumoral de modelo de melanoma para *screening* de drogas anticâncer. A plataforma foi constituída pelo cocultivo de esferoides de células de melanoma humano (SK-MEL-28) e células endoteliais (HUVECs) na superfície inferior de hidrogéis de BNC-COL. Para a construção dessa plataforma foram necessárias inúmeras etapas. O colágeno do tipo I foi imobilizado na estrutura do hidrogel de nanocelulose bacteriana formando o hidrogel BNC-COL. As HUVECs e os esferoides de SK-MEL demonstraram comportamento celular dependente da microestrutura e da composição química do hidrogel. Por isso, apresentaram melhores resultados na superfície inferior do hidrogel BNC-COL. Os esferoides de SK-MEL-28 foram formados em três tempos diferentes com avaliação de morfologia e viabilidade celular, sendo o segundo dia de formação utilizado para o cocultivo, por exibir uma estrutura bem definida com bordas arredondadas em um período menor e mantendo a viabilidade celular.

O cocultivo das HUVECs com os esferoides de SK-MEL-28 na superfície inferior do hidrogel de BNC-COL demonstrou resultados positivos nas condições 2 e 3, sendo confirmados através da morfologia visualizada por microscopia em campo claro, micrografias e o uso do *software* Wimasis. A condição 2 de cocultivo foi a selecionada para obtenção do modelo de melanoma 3D. Então, o modelo de melanoma 3D foi cultivado por 7 dias, sendo analisados os dias 1, 3 e 7 de cocultivo. Conforme os resultados, foi possível perceber que com o passar dos dias houve uma maior migração celular das células tumorais, sendo assim o sétimo dia o selecionado para o modelo final empregado no teste com a DOX.

O modelo de melanoma 3D quando em contato com a DOX por 24 h obteve o resultado mais relevante de atividade metabólica, quando comparado com os demais modelos. Na maior concentração molar de DOX testada, o modelo de melanoma 3D teve redução de 37 % na atividade metabólica contra 80 % do modelo de monocamada 2D, ou seja, metade do valor encontrado no modelo de monocamada 2D.

Portanto, o modelo desenvolvido e proposto por esse trabalho mostra vantagens frente a modelos já utilizados na literatura. O uso de mais de uma linhagem celular corrobora com os resultados encontrados em outros trabalhos, que relatam a importância do

microambiente tumoral no desenvolvimento do tumor. Dessa forma, o modelo de melanoma 3D torna-se promissor e uma plataforma alternativa para *screening* de drogas anticâncer.

Como perspectivas futuras desse trabalho encontram-se as marcações celulares da SK-MEL-28 e HUVECs, a fim de identificar cada uma delas, bem como identificar as células características do processo de angiogênese, células *tip* e *stalk*. Análises por microscopia de campo claro do modelo de monocamada 2D, modelo esferoide 3D e modelo de melanoma 3D após a exposição a DOX durante 24 h, com o intuito de avaliar qualitativamente o efeito da DOX nesses modelos. A utilização do software *Wimasis* para quantificar a área afetada pela DOX no modelo de melanoma 3D. E por fim, a realização de um tratamento com DOX por períodos mais prolongados, expondo as células por um tempo determinado ao fármaco e após restabelecendo a cultura, com a finalidade de acompanhar a resistência e/ou sensibilidade a DOX das células no modelo de monocamada 2D, modelo esferoide 3D e modelo de melanoma 3D.

REFERÊNCIAS

- ANTOINE, E. E.; VLACHOS, P. P.; RYLANDER, M. N. Review of collagen i hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: Characterization of mechanics, structure, and transport. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 20, n. 6, p. 683–696, 2014.
- ANTONI, D. et al. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 2015.
- ARAÚJO, K. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE GLICOCONJUGADOS SINTÉTICOS**. [s.l.] Universidade Federal de São João Del-Rei, 2016.
- BACAKOVA, L. et al. Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 164, 2019.
- BARROS, A. S. et al. Comparative study of the therapeutic effect of Doxorubicin and Resveratrol combination on 2D and 3D (spheroids) cell culture models. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 551, n. 1–2, p. 76–83, 2018.
- BENTON, G. et al. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 79, p. 3–18, 2014.
- BERENS, E. B. et al. A cancer cell spheroid assay to assess invasion in a 3D setting. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 105, p. 1–6, 2015.
- BERTI, F. V. **Desenvolvimento de Estruturas Vasculares Endotelizadas em Scaffolds de Celulose Bacteriana**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- BERTI, F. V. et al. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 8, p. 4684–4691, 2013.
- BLACHER, S. et al. Cell invasion in the spheroid sprouting assay: A spatial organisation analysis adaptable to cell behaviour. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.
- CARDOSO, A. C. F. **Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral** Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2018.
- CARLSON, C. L. Effectiveness of the World Health Organization cancer pain relief

- guidelines: An integrative review. **Journal of Pain Research**, v. 9, p. 515–534, 2016.
- CAVIGLIA, G.; MORRO, A. A model for cell migration in tumour growth. **Mechanics Research Communications**, v. 73, p. 1–6, 2016.
- CEN, L. et al. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. **Pediatr Res**, v. 63, n. 5, p. 492–496, 2008.
- CHAROEN, K. M. et al. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2264–2271, 2014.
- CHEN, L. et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1437–1444, 2012.
- CISNEROS CASTILLO, L. R. et al. A Novel Computer-Assisted Approach to evaluate Multicellular Tumor Spheroid Invasion Assay. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–16, 2016.
- COLLA, G. **ESTRUTURAS TUBULARES DE NANOCELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA TECIDUAL VASCULAR**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
- COOPER, G. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd Editio ed. [s.l.] Sinauer Associates, 2000.
- CRAYTHORNE, E.; AL-NIAMI, F. Skin cancer. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 7, p. 431–434, 2017.
- DA SILVA, S. M. et al. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DA COMBINAÇÃO DE PIOGLITAZONA E INFRA DOSES DE DOXORRUBICINA. v. 3, n. 2, p. 105–114, 2017.
- DENARD, B.; LEE, C.; YE, J. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. **eLife**, v. 2012, n. 1, p. 1–14, 2012.
- DINI, S. et al. Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 13, n. 123, 2016.

DONG, C.; LV, Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. **polymers**, v. 42, n. 8, p. 1–20, 2016.

DOS REIS, E. . **FUNCIONALIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE NANOCELULOSE BACTERIANA PARA MIMETIZAÇÃO DE MICROAMBIENTE TUMORAL**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

DROR, S. et al. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. **Nature Cell Biology**, v. 18, n. 9, p. 1006–1017, 2016.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, 2003.

EDMONDSON, R. et al. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 2014.

EL-SHERBINY, I. M.; YACOUB, M. H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. **Global cardiology science & practice**, v. 2013, n. 3, p. 316–42, 2013.

ELIA, I.; DOGLIONI, G.; FENDT, S. M. Metabolic Hallmarks of Metastasis Formation. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 8, p. 673–684, 2018.

EMON, B. et al. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 279–287, 2018.

ERIKSON, A. et al. Physical and Chemical Modifications of Collagen Gels: Impact on Diffusion. **Biopolymers**, v. 87, n. 5, p. 279–292, 2007.

EUROFARMA. **Cloridrato de doxorrubicina Bula para profissional da saúde**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23470442016&pIdAnexo=3926691>.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, 1971.

FOLKMAN, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Annals of surgery**, v. 175, n. 3, p. 409–416, 1972.

FUS, Ł. P.; GÓRNICKA, B. Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. **Central European Journal of Urology**, v. 69, n. 3, p. 258–263, 2016.

- GATENHOLM, PAUL; KLEMM, D. Bacterial Nanocellulose as a Renewable Material for Biomedical Applications. **Mrs Bulletin**, v. 35, n. March 2010, p. 1–11, 2010.
- GITSCHIER, H.; FANG, Y.; EGLIN, R. M. **3D Cell Culture - A Rapidly Emerging Technique for Drug Discovery**. Disponível em: <<https://www.ddw-online.com/drug-discovery/p316723-3d-cell-culture-a-rapidly-emerging-technique-for-drug-discovery.html>>.
- GOERTZEN, C.; EYMAEL, D.; MAGALHAES, M. Three-Dimensional Quantification of Spheroid Degradation-Dependent Invasion and Invadopodia Formation. **Biological Procedures Online**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2018.
- GOLAN, T. et al. Interactions of Melanoma Cells with Distal Keratinocytes Trigger Metastasis via Notch Signaling Inhibition of MITF. **Molecular Cell**, v. 59, n. 4, p. 664–676, 2015.
- GONG, X. et al. Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.
- GUIMARÃES, R. S. F.; TAVEIRA, C. C. Fundamentos de Farmacología. v. 11, n. 1, p. 115, 2014.
- HAM, S. L. et al. Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 9, p. 939–954, 2016.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.
- HERRAIZ, C. et al. Functional interplay between secreted ligands and receptors in melanoma. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 78, p. 73–84, 2017.
- HOLLE, A. W.; YOUNG, J. L.; SPATZ, J. P. In vitro cancer cell-ECM interactions inform in vivo cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 270–279, 2016.
- HSIAO, W. C.; YOUNG, T. H. Characteristics of melanocyte spheroids formed through different biomaterial-induced processes. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 118, n. 1P1, p. 152–161, 2018.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer melanoma em números**. Disponível em: <[https://www.bms.com/assets/bms/brazil/documents/Infográfico Câncer](https://www.bms.com/assets/bms/brazil/documents/Infográfico_Câncer)>

Melanoma.pdf>.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>.

IQVIA INSTITUTE. **Global Oncology Trends 2018**. Disponível em: <<https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/global-oncology-trends-2018>>.

IRVIN, M. W. et al. NIH Public Access. v. 27, n. 4, p. 1–19, 2014.

KARAMYSHEVA, A. F. Mechanisms of Angiogenesis. **Biochemistry (Moscow) Original Russian Text** © A. F. Karamysheva, v. 73, n. 7, p. 7511762–9355948, 2008.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5 SPEC. ISS., p. 378–386, 2005.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

KLEMM, D. et al. **Bacterial Nanocellulose: A Sophisticated Multifunctional Material**. [s.l.] CRC Press, 2012.

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

KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 6, p. 746–756, 2014.

KO, J. et al. Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. **Lab on a Chip**, v. 19, n. 17, p. 2822–2833, 2019.

KUMAR, V.; YANG, T. HNO₃/H₃PO₄-NANO₂ mediated oxidation of cellulose - Preparation and characterization of bioabsorbable oxidized celluloses in high yields and with different levels of oxidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 4, p. 403–412, 2002.

KUZMENKO, V. et al. Universal method for protein bioconjugation with nanocellulose scaffolds for increased cell adhesion. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 8, p. 4599–4607, 2013.

LAMICHHANE, S. P. et al. Recapitulating epithelial tumor microenvironment in vitro using three dimensional tri-culture of human epithelial, endothelial, and mesenchymal cells. **BMC**

Cancer, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2016.

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

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 133–144, 2017.

LAZZARI, G. et al. Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. **Acta Biomaterialia**, v. 78, p. 296–307, 2018.

LI, W. et al. Electrospun nanofibers immobilized with collagen for neural stem cells culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 847–854, 2008.

LI, Y.; KUMACHEVA, E. Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. **Science Advances**, v. 4, n. 4, p. 1–11, 2018.

LIU, T. Y. et al. Hemocompatibility and anaphylatoxin formation of protein-immobilizing polyacrylonitrile hemodialysis membrane. **Biomaterials**, v. 26, n. 12, p. 1437–1444, 2005.

LOPES, F. G. **ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS Florianópolis**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

MAROTTA, M.; MARTINO, G. Sensitive spectrophotometric method for the quantitative estimation of collagen. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 86–90, 1985.

MEYER, A. C. .; DOS REIS, E. .; PORTO, L. . IMOBILIZAÇÃO DE COLÁGENO HUMANO TIPO I EM MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA. In: **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química**. [s.l: s.n.]. p. 160–165.

MILLER, J. S. et al. Bioactive hydrogels made from step-growth derived PEG-peptide macromers. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3736–3743, 2010.

NAPOLITANO, A. P. et al. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. **BioTechniques**, v. 43, n. 4, p. 494–500, 2007.

NEGRÃO, M. R. B. S. S. DA S. **Mecanismos de modulação da inflamação e angiogênese por polifenóis naturais**. [s.l.] Faculdade de Medicina do Porto, 2011.

NGUYEN, B.-N. B. et al. Collagen Hydrogel Scaffold Promotes Mesenchymal Stem Cell and

Endothelial Cell Coculture for Bone Tissue Engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, 2017.

OGDEN, S.; TELFER, N. R. Skin cancer. **Medicine**, v. 37, n. 6, p. 305–308, 2009.

OLIVIERO, O.; VENTRE, M.; NETTI, P. A. Functional porous hydrogels to study angiogenesis under the effect of controlled release of vascular endothelial growth factor. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 9, p. 3294–3301, 2012.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 2010.

PARK, J.; PARK, Y.; JUNG, J. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 83–88, 2003.

PEREIRA, J. et al. Papel da célula endotelial em neoplasias malignas hematológicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 3, p. 223–228, 2008.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277–1286, 2011.

PHILIPPIDIS, A. **Top 10 Best-Selling Cancer Drugs of 2018**. Disponível em: <<https://www.genengnews.com/a-lists/top-10-best-selling-cancer-drugs-of-2018/>>.

PINHO, M. D. S. L. ANGIOGÊNESE: O GATILHO PROLIFERATIVO. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, p. 396–402, 15 dez. 2005.

RAMANUJAN, S. et al. Diffusion and convection in collagen gels: Implications for transport in the tumor interstitium. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 3, p. 1650–1660, 2002.

RAMBO, C. R. et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 549–554, 2008.

RANJBAR-MOHAMMADI, M. et al. Multi-cellular tumor spheroids formation of colorectal cancer cells on Gelatin/PLCL and Collagen/PLCL nanofibrous scaffolds. **European Polymer Journal**, v. 115, p. 115–124, 2019.

RAPE, A. D.; KUMAR, S. A composite hydrogel platform for the dissection of tumor cell migration at tissue interfaces. **Biomaterials**, v. 35, n. 31, p. 8846–8853, 2014.

- REIS, E. M. DO. et al. Bacterial nanocellulose-IKVAV hydrogel matrix modulates melanoma tumor cell adhesion and proliferation and induces vasculogenic mimicry in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 106, n. 8, p. 2741–2749, 2017.
- RIJAL, G.; LI, W. 3D scaffolds in breast cancer research. **Biomaterials**, v. 81, p. 135–156, 2016.
- SALEH, N. A. **Cultura Celular Tridimensional: Desenvolvimento De Um Modelo Para Avaliação Da Relação Entre O Microambiente Tum Oral E a Ação De Novos Agentes Antitumorais**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- SAPUDOM, J. et al. The phenotype of cancer cell invasion controlled by fibril diameter and pore size of 3D collagen networks. **Biomaterials**, v. 52, n. 1, p. 367–375, 2015.
- SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 41, p. 22102–22112, 2012.
- SASKA, S. et al. Nanocellulose-collagen-apatite composite associated with osteogenic growth peptide bone regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 467–476, 2017.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.
- SCHÜZ, N.; EID, M. **Sun Exposure and Skin Cancer Prevention**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 23
- SHOVAL, H. et al. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 795–801, 2004.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Câncer da pele**. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>>. Acesso em: 10 set. 2018.
- SOLOUK, A. et al. The study of collagen immobilization on a novel nanocomposite to enhance cell adhesion and growth. **Iranian Biomedical Journal**, v. 15, n. 1–2, p. 6–14, 2011.

SONG, H. H. G.; PARK, K. M.; GERECHE, S. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 79, p. 19–29, 2014.

SRINIVASAN, M.; RAJABI, M.; MOUSA, S. A. **Nanobiomaterials in cancer therapy**. Seventh Ed ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

STUART, M. P. et al. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

SZOT, C. S. et al. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. **Biomaterials**, v. 32, n. 31, p. 7905–7912, 2011.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 49, n. 5, p. 330–352, 2007.

TAYMAZ-NIKEREL, H. et al. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

TEVIS, K. M. et al. Mimicking the tumor microenvironment to regulate macrophage phenotype and assessing chemotherapeutic efficacy in embedded cancer cell/macrophage spheroid models. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 271–279, 2016.

TEVIS, K. M.; COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. Embedded Spheroids as Models of the Cancer Microenvironment. **Advanced Biosystems**, v. 1, n. 10, 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC, I. **A New Dimension of Cell Culture: The Rise of Spheroid Culture Systems**. Disponível em: <<https://cellculturedish.com/cell-culture-spheroid-culture-systems/>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

TUNG, J. J.; TATTERSALL, I. W.; KITAJEWSKI, J. Fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 1–14, 2012.

UNSWORTH, L. et al. Engineering 3D Cellularized Collagen Gels for Vascular Tissue Regeneration. **Journal of Visualized Experiments**, n. 100, p. 1–12, 2015.

VERBRIDGE, S. S.; CHANDLER, E. M.; FISCHBACH, C. Tissue-Engineered Three-Dimensional Tumor Models to Study Tumor Angiogenesis. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 7, p. 2147–2152, 2010.

VIEIRA, P. C. **Ensaio pré-clínico da desintegrina recombinante DisBa-01 na angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos em camundongos** Ensaio pré-clínico da desintegrina recombinante DisBa-01 na angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos em. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

VINCI, M.; BOX, C.; ECCLES, S. A. Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 99, p. 1–9, 2015.

VÖRSMANN, H. et al. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 7, 2013.

WANG, X. et al. Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 19, p. 4667–4679, 2013.

WATSON, M. et al. Melanoma surveillance in the United States: Overview of methods. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 5 SUPPL. 1, p. S6.e1-S6.e12, 2011.

WELCH, D. R. Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? **Breast disease**, v. 26, n. 205, p. 3–12, 2007.

WEN, X. et al. Immobilization of collagen peptide on dialdehyde bacterial cellulose nanofibers via covalent bonds for tissue engineering and regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4623–4637, 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pricing of cancer medicines and its impacts.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277190/9789241515115-eng.pdf?ua=1>>.

XU, K.; CLEAVER, O. Tubulogenesis during blood vessel formation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 9, p. 993–1004, 2011.

XU, S. et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–22, 2019.

YUAN, T. et al. Co-culture of tumor spheroids and monocytes in a collagen matrix-embedded microfluidic device to study the migration of breast cancer cells. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, n. 2, p. 331–336, 2018.

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. January, p. 1–11, 2016.

ZANONI, M. et al. Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 289–301, 2019.

ZHANG, D. et al. Mechanochemistry in cancer cell metastasis. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, n. 1, p. 7–14, 2018a.

ZHANG, D. et al. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 1, p. 129–138, 2018b.

ZHANG, W. et al. Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. **Analytical Biochemistry**, v. 515, p. 47–54, 2016.

ZHIJIANG, CAI; YANG, G. Bacterial Cellulose/Collagen Composite: Characterization and First Evaluation of Cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2658–2667, 2011.

APÊNDICE A – Curva padrão de quantificação de colágeno por *Sirius red*.

Curva padrão e equação da reta da quantificação de colágeno por *Sirius red*.

