

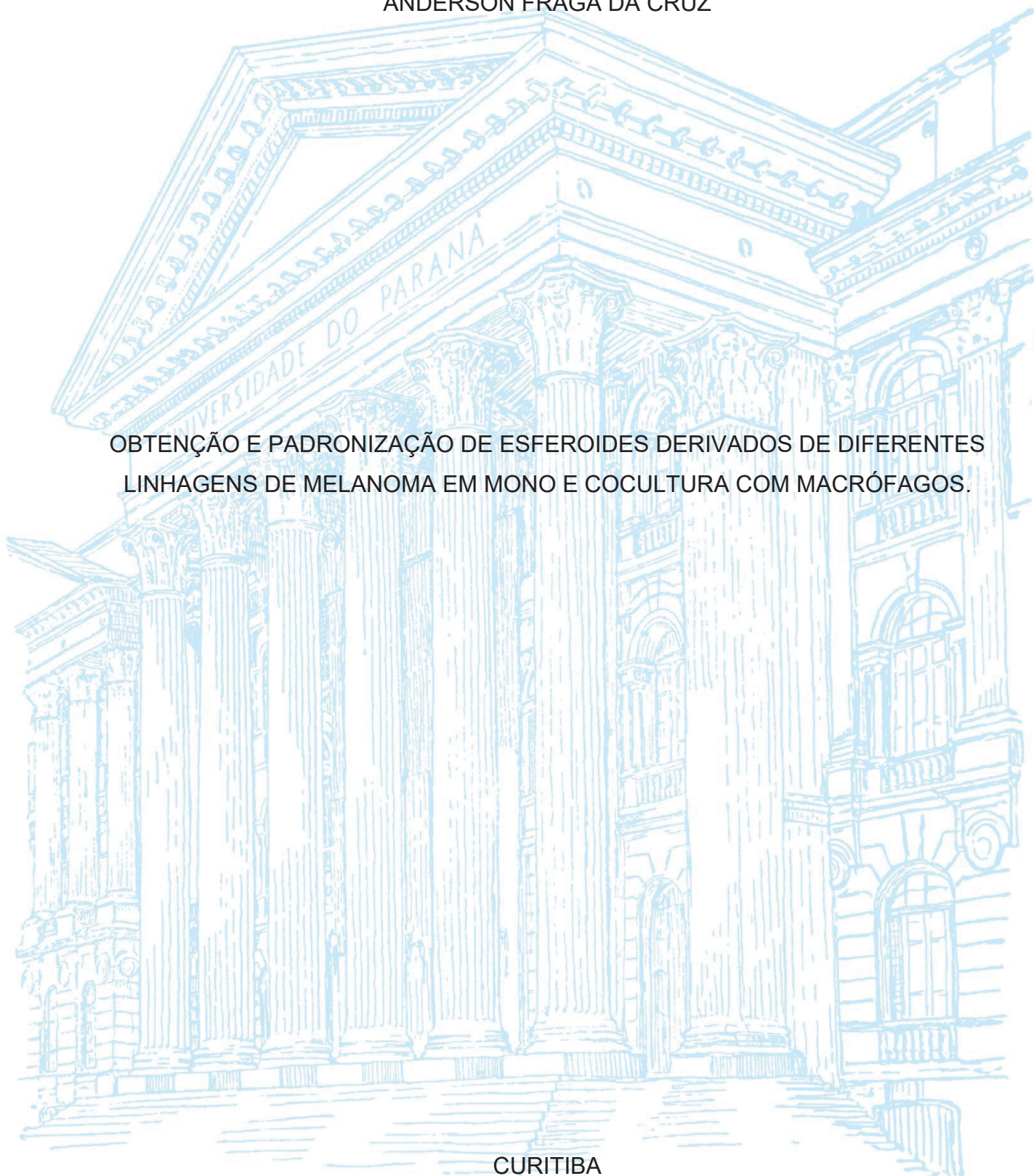
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDERSON FRAGA DA CRUZ

OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE ESFEROIDES DERIVADOS DE DIFERENTES
LINHAGENS DE MELANOMA EM MONO E COCULTURA COM MACRÓFAGOS.

CURITIBA

2022



ANDERSON FRAGA DA CRUZ

OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE ESFEROIDES DERIVADOS DE DIFERENTES
LINHAGENS DE MELANOMA EM MONO E COCULTURA COM MACRÓFAGOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia celular e molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Camargo. de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Daniel de Lima Bellan

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Cruz, Anderson Fraga da.

Obtenção e padronização de esferoides derivados de diferentes linhagens de melanoma em mono e cocultura com macrófagos. / Anderson Fraga da Cruz. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Carolina Camargo de Oliveira.

Coorientador: Daniel de Lima Bellan.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Técnicas de Cocultura. 2. Melanoma. 3. Imunologia. 4. Macrófagos. 5. Sistema Imune. I. Título. II. Oliveira, Carolina Camargo de. III. Bellan, Daniel de Lima. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDERSON FRAGA DA CRUZ** intitulada: **Obtenção e padronização de esferoides derivados de diferentes linhagens de melanoma em mono e cocultura com macrófagos.**, sob orientação da Profa. Dra. CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica
30/08/2022 16:15:32.0
CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
02/09/2022 14:10:22.0
DANIELA FLORÊNCIO MALUF
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
31/08/2022 09:16:14.0
KAMILA SWIECH ANTONIETTO
Avaliador Externo (BIOIMPROVE BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA)

Assinatura Eletrônica
06/09/2022 13:00:47.0
DANIEL DE LIMA BELLAN
Coorientador(a) Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à Mirely, a pessoa mais especial que passou pela minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que, mesmo com todos os problemas, nunca deixaram de me motivar e me ajudar a chegar até aqui. Eu não seria nada sem vocês.

Aos meus irmãos, que me representam em São Paulo, cuidam dos meus pais quando não posso estar e que, principalmente, me deram os melhores 8 presentes que eu poderia receber.

Aos meus sobrinhos, Geovanna, Luiza, Ian, Ana Clara, Matheus, Lorena, Miguel e Maitê, que são as pessoas que mais amo nesse mundo.

Aos meus avôs, Cicero e Valdomiro, que se foram durante o meu período de mestrado. Vô Valdomiro, mesmo distante, sempre que pode foi uma presença calma na minha vida. Vô Cicero, com quem eu passei tantos finais de semana lendo jornal, assistindo novela ou passando a tarde na praça. Minhas sinceras saudades para os dois.

As minhas avós, Margarida e Margarida (sim), por serem fortes nas adversidades e por sempre terem sido exemplo de felicidade e tranquilidade.

A minha tia Laura, que sempre me incentivou a continuar minha caminhada longe de casa.

A minhas primas, Graziely, Natasha e Mirely, que mesmo distantes são as melhores pessoas que tenho na vida.

A todos outros membros da minha família, tios, tias primos... A pior parte de morar longe é não conviver mais com todos vocês.

A professora Carolina pelos (até agora) quase 6 anos de orientação, por sempre me ouvir, entender e animar. Ainda agradeço sua sutileza incompreendida e espero contar com ela por muito mais anos.

Ao meu coorientador, professor Bellan, por sempre, desde antes de me orientar, ser um exemplo do que é ser um cientista.

A Jenifer, que foi a primeira pessoa a me acolher no laboratório. Me ensinou a pensar, escrever, repensar e reescrever. É a grande responsável por tudo que sou profissionalmente e é uma das principais inspirações do que quero ser no futuro.

A professora Fernanda, que sempre me motivou, me ouviu e fez rir. Tudo que aprendi com você até hoje jamais será esquecido.

Aos professores Célia e Edvaldo, por todo apoio no laboratório.

A Keila e Açucena. Keila é a pessoa mais doce que já conheci e que se tornou uma saudade diária no lab. Cucu, uma das melhores pessoas que já conheci (pelo menos comigo) que nunca cansa de tentar me colocar pra cima (mesmo não dando muito certo). Vocês são grandes amigas e espero tê-las comigo por muito tempo.

A Aline e Yasmin, também grandes amigas que fiz graças ao lab, com quem almoço, tomo coquinha e converso durante os intervalos. Eu nunca teria chegado até aqui sem o apoio e amizade de vocês.

A Jacqueline, que chegou há pouco tempo, mas foi parte importante na obtenção das imagens de confocal deste trabalho e que vem se tornando uma boa amiga.

Bruna, Camila, Gabriel, Jessica, Julia e Kaique. Alguns estão a pouco tempo, outros já não estão mais no lab, mas todos contribuíram muito com meu trabalho, seja conversando sobre o projeto ou passando café no meio da tarde.

Aos colegas de laboratório, pela convivência e troca diária.

Ao Josiell, por ter me ensinado pelo menos 5 novas linguagens e por ter sido minha companhia nos últimos meses, me fazendo não surtar em muitos momentos.

Ao LCIN, por ser o melhor lugar da UFPR.

Ao CTAF-UFPR, pelas imagens de confocal.

Aos laboratórios dos professores Francisco e Lucélia pelo empréstimo de equipamentos.

A CAPES pela bolsa.

A CAPES/CNPq/FUNPAR por, de alguma forma, financiar esse trabalho.

A Universidade Federal do Paraná, por ter sido e continuar sendo minha casa.

RESUMO

Modelos tridimensionais vêm sendo vastamente utilizados por representar a arquitetura dos tecidos *in vivo*, fator que está extremamente relacionado com comportamento celular. É interessante a utilização desses modelos com células tumorais pois características como as do microambiente tumoral podem ser mimetizadas. O microambiente tumoral também se caracteriza pela presença de células não tumorais, em especial macrófagos, que podem ser cocultivados tridimensionalmente, criando assim uma plataforma para, por exemplo, testar novos fármacos. Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi obter e padronizar modelos tridimensionais *in vitro* de melanoma humano em mono e cocultura com célula do sistema imunitário e avaliar o comportamento dos modelos na presença ou ausência de fármacos. Utilizamos 4 linhagens de melanoma humano (Sk-Mel 28, Sk-Mel 147, MeWo e CHL-1), cada uma representativa dos principais subgrupos da classificação genômica da doença (*BRAF*, *NRAS*, *NF-1* e triplo negativo, respectivamente). Além dessas, foi utilizada também a linhagem THP-1 como modelo de macrófago humano. Foram testados três métodos para obtenção dos esferoides, *hanging drop*, matriz de baixa adesão e sensibilização de placa. Foi possível obter esferoides de monocultura e cocultura de todas as células. Utilizando cultivo bidimensional para cada linhagem, foi determinado o valor de concentração inibitória média (IC₅₀) para dois fármacos-referência utilizados na terapia-alvo: vemurafenib, que atua como inibidor competitivo da proteína BRAF mutada, e cobimetinib, que atua inibindo a atividade da proteína MEK1/2. Na sequência, os esferoides foram expostos à 3 concentrações dos fármacos e os parâmetros de tamanho, viabilidade e morte celular foram avaliados. Os esferoides derivados da linhagem de célula Sk-Mel 28, que possui mutação em BRAF foram mais sensíveis a ambos conforme esperado, sendo observada diminuição no tamanho dos esferoides. Ao marcar os esferoides com iodeto de propídio foi possível avaliar ainda que essa redução não ocorreu por processo de morte celular e sim, provavelmente, por interferência no processo de divisão das células. Comparando-se os resultados obtidos entre os modelos de mono e cocultura, observou-se que os esferoides em cocultura tendem a ser mais resistentes que aqueles em monocultura, uma vez que eles possuem tamanho mais próximo aos do controle, evidenciando o papel do macrófago na resistência tumoral. Dessa forma este trabalho traz a padronização de obtenção de modelo tridimensional de células de melanoma com diferentes perfis genéticos, com ou sem células do sistema imune, que são responsivos a fármacos e que podem ser utilizados na prospecção de novas drogas. Ainda, este trabalho pode ser utilizado como um passo inicial para a adoção de métodos de obtenção de estruturas tridimensionais *ex vivo*, utilizando tecido tumoral derivado de pacientes contendo perfis genéticos semelhantes aos testados.

Palavras-chave: Cocultivo; Esferoide; Melanoma; Terapia alvo.

ABSTRACT

Three-dimensional models are vastly used and can represent the *in vivo* tissue architecture and cell behavior. Models with tumor cells can mimic many *in vivo* characteristics such as those related to tumor microenvironment. The tumor microenvironment also presents non-tumor cells, especially macrophages, which can be three-dimensionally co-cultured with tumor cells, creating a drug discovery test platform, for instance. Therefore, this work aims to obtain and standardize *in vitro* three-dimensional models of human melanoma and immune system cells lines and evaluate these models behavior in the presence or absence of drugs. Four human melanoma cell lines (Sk-Mel 28, Sk-Mel 147, MeWo and CHL-1), each representative of the disease main genomic classification subgroups (*BRAF*, *NRAS*, *NF-1*, and triple negative, respectively). In addition, the THP-1 cell line was used as a model of human macrophage. Three methods were evaluated to obtain cell spheroids: hanging drop, low adhesion matrix and plate sensibilization. It was possible to obtain monoculture and coculture spheroids from all cells. Two-dimensional culture of each melanoma cell line was used to determine the mean inhibitory concentration value (IC_{50}) of two reference drugs used in targeted therapy: vemurafenib, which inhibits the *BRAF* mutated protein, and cobimetinib, which inhibits MEK1/2 protein activity. Subsequently, the spheroids were exposed to three drug concentrations and the parameters of size, viability, and cell death were evaluated. The spheroids derived from Sk-Mel 28 cell line, which are *BRAF* mutated, were more sensitive to both drugs, as expected, with a decreased spheroids size. Spheroids stained with propidium iodide showed low levels of fluorescence, indicating that the decrease in size occurred due to cell division/cell cycle arrest and not to cell death. Comparing mono and coculture models, spheroids in coculture tend to be more resistant than those in monoculture, considering its equivalent size compared to control, evidencing the macrophage role in tumor resistance. Hence, this work provides standards for obtaining three-dimensional models of melanoma tumor cells bearing different genetic profiles, including or not immune system cells, which are responsive to drugs and that could be useful to new drugs prospection. Furthermore, this work can be used as an initial step in the adoption of methods to obtain *ex vivo* three-dimensional structures derived from patient's tissue bearing genetic profiles like those tested.

Keywords: Coculture; Melanoma; Spheroids; Target therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Acúmulo sequencial de mutações.....	18
Figura 2 - Mutações em vias de sinalização.....	21
Figura 3 - Representação do microambiente tumoral	26
Figura 4 - Cultivo 2D para cultivo 3D.....	29
Figura 5 - Exemplo da aplicação da medicina de precisão	34
Figura 6 - Métodos utilizados neste estudo para produção de esferoides	40
Figura 7 - Esferoides em monocultura da célula MeWo	43
Figura 8 - Esferoides em cocultura de MeWo e THP-1	44
Figura 9 - Esferoides em monocultura da célula Sk-Mel 147	46
Figura 10 - Esferoides em cocultura de Sk-Mel 147 e THP-1	47
Figura 11 - Esferoides em monocultura da célula Sk-Mel 28	49
Figura 12 - Esferoides em cocultura de Sk-Mel 28 e THP-1	50
Figura 13 – Esferoides em monocultura da célula CHL-1	51
Figura 14 - Esferoides em cocultura de chl-1 e THP-1.....	52
Figura 15 - Esferoides de MeWo expostos aos inibidores	57
Figura 16 - Esferoides de MeWo em microscopia confocal	58
Figura 17 - Esferoides de Sk-Mel 147 expostos aos inibidores.....	60
Figura 18 - Esferoides de Sk-Mel 147 em microscopia confocal.....	61
Figura 19 - Esferoides de Sk-Mel 28 expostos aos inibidores.....	62
Figura 20 - Esferoides de Sk-Mel 28 em microscopia confocal.....	63
Figura 21 - Esferoides de CHL-1 expostos aos inibidores.....	65
Figura 22 - Esferoides de CHL-1 em microscopia confocal.....	66
Figura 23 - Comparação dos esferoides obtidos.....	72
Figura 24 - Comparação dos esferoides em monocultura expostos aos inibidores...79	
Figura 25 - Comparação dos esferoides em cocultura expostos aos inibidores.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - IC50 DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	55
GRÁFICO 2 - GENES COM MAIS MUTAÇÕES EM MELANOMA.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Histórico dos principais tratamentos para melanoma.....	24
Tabela 2 - Medidas dos esferoides de MeWo	44
Tabela 3 - Medidas dos esferoides de Sk-Mel 147	45
Tabela 4 - Medidas dos esferoides de Sk-Mel 28	49
Tabela 5 - Medidas dos esferoides de CHL-1	53
Tabela 6 - Sumário das técnicas utilizadas para obtenção de esferoides de cada célula.....	54
Tabela 7 - Concentrações de IC ₅₀ dos inibidores	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 CÂNCER	17
2.1.1 MELANOMA	18
2.1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL	25
2.1.3 CULTIVO TRIDIMENSIONAL	28
2.2 MEDICINA DE PRECISÃO	33
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 CULTIVO CELULAR	36
4.2 INIBIDORES	37
4.3 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (IC ₅₀) DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	37
4.4 FORMAÇÃO DE ESFEROIDES	38
4.4.1 SENSIBILIZAÇÃO DE PLACA	38
4.4.2 MATRIZ DE BAIXA ADESÃO	39
4.4.3 HANGING DROP	39
4.5 ESFEROIDES EXPOSTOS AOS INIBIDORES	40
4.6 MORTE CELULAR	41
5 RESULTADOS	42
5.1 DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS GERAIS E ESTRUTURAIS PARA PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DOS ESFEROIDES	42
5.1.1 MeWo (<i>NF-1</i>)	42
5.1.2 Sk-Mel 147 (<i>NRAS</i>)	45
5.1.3 Sk-Mel 28 (<i>BRAF</i>)	48
5.1.4 CHL-1 (TRIPLO NEGATIVO)	50
5.2 IC ₅₀ EM CULTIVO BIDIMENSIONAL	53
5.3 AVALIAÇÃO DO MODELO 3D	56
5.3.1 MeWo (<i>NF-1</i>)	56
5.3.2 Sk-Mel 147 (<i>NRAS</i>)	59
5.3.3 Sk-Mel 28 (<i>BRAF</i>)	59
5.3.4 CHL-1 (triplo negativa)	64

6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO I - PREPARO DA AGAROSE.....	101
ANEXO II - TÉCNICA DA SENSIBILIZAÇÃO DE PLACA.....	103
ANEXO III - PLAQUEAMENTO EM MATRIZ DE BAIXA ADESÃO.....	105
ANEXO IV – TÉCNICA DO HANGING DROP.....	107

1 INTRODUÇÃO

O melanoma, um dos tipos mais comuns de cânceres de pele, apresenta altas taxas de mutações e está associado a um prognóstico negativo quando tardiamente diagnosticado (INCA, 2020). Diferentes abordagens de tratamentos vêm sendo utilizadas. A mais antiga, utilizando quimioterápicos ou radioterapia, atinge determinados componentes celulares (DNA, citoesqueleto), levando as células à morte. Dessa forma, os alvos tendem a ter baixa especificidade celular e, concomitante a isso, baixa responsividade. Formas de terapias mais recentes, como a terapia alvo direcionada às moléculas afetadas por mutações específicas e frequentemente presentes no DNA de células tumorais, assim como a imunoterapia que age modulando a resposta imune do paciente e afetando o microambiente tumoral (DOMINGUES et al., 2018), vêm sendo utilizadas. Contudo, ainda assim, não há fármacos que atuem no melanoma avançado de forma a garantir que não haja recidiva da doença.

O desenvolvimento de tratamentos mais eficazes assim como melhor direcionamento dos tratamentos disponíveis se faz necessário. No caso do câncer, onde a mesma doença possui diversas nuances genótípicas e fenótípicas, o uso da medicina de precisão pode melhorar o prognóstico, diminuir o tempo de tratamento e consequentemente os efeitos colaterais associados a ele (MUKHERJEE, 2019; MALONE et al., 2020). Uma vez que a medicina de precisão leva em consideração características individuais na adoção da melhor abordagem terapêutica, o emprego de técnicas de estudo *in vitro* utilizando células do próprio paciente no teste de tratamentos possibilita seu desenvolvimento (PAULI et al., 2017; PRENDERGAST; BURDICK, 2019).

Existem diferentes abordagens e modelos para estudos *in vitro*, e a adoção de cada um depende da complexidade do estudo a ser realizado (MENA et al., 2017). Metodologias bidimensionais (2D) apresentam boa reprodutibilidade e acurácia em resultados que demandam avaliação de parâmetros isolados. Contudo, a utilização de metodologias tridimensionais (3D) para crescimento celular tende a expressar melhor todos os parâmetros moleculares e espaciais de um tecido (KATT et al., 2016; FONTOURA et al., 2020). Independente do modelo 3D utilizado, alguns parâmetros devem ser considerados: 1) a origem da célula utilizada é de extrema importância, pois, uma vez que visa-se reconstruir *in vitro* a organização tecidual do organismo, é

preciso entender como ocorre a disposição daquela célula naturalmente; 2) aspectos metabólicos da própria célula, como pressão de oxigênio e pH, para recriar suas condições fisiológicas; 3) composição de matriz extracelular (MEC), uma vez que diferentes tecidos possuem diferentes composições e padrões de distribuição das moléculas na MEC; 4) respostas celulares a sinais bioquímicos adequados, pois um bom modelo 3D deve apresentar expressão e presença de moléculas em níveis semelhantes ao do organismo (TANNER; GOTTESMAN, 2015).

Uma vez que o melanoma se apresenta de forma heterogênea entre os pacientes, apresentando variações nas mutações genéticas encontradas (*BRAF*, *NRAS*, *NF-1*, sendo as principais) (DAVIS et al., 2018), além de complexas interações no microambiente tumoral entre os componentes celulares, como fibroblastos e células do sistema imunitário, e a MEC (FISCHER et al., 2018; GUO et al., 2020; SCHÄFER et al., 2022), a utilização de modelo 3D *in vitro* para predição da eficácia de tratamento poderá contribuir significativamente no aumento da sobrevivência desses pacientes. Além disso estudos *in vitro* são um importante meio de avaliar comportamento celular, tanto por diminuir o uso de animais e todas suas discussões éticas, quanto por contribuir com a diminuição de ruídos fisiológicos, uma vez que a pesquisa pode ser focada em aspectos moleculares específicos ao utilizar ensaios que mimetizam o comportamento celular e processos de progressão tumoral. Tendo tudo isso em vista, modelos tridimensionais utilizando células com genotipagem conhecida e mutações descritas podem ser um ponto inicial para se comparar a atividade antitumoral de diferentes terapias alvo sobre modelos 3D, levando-se em consideração padrões do microambiente tumoral e do metabolismo celular. Sendo assim, esse trabalho visa o desenvolvimento de modelo 3D utilizando células de linhagem de melanoma humano, portadoras ou não de mutação em *BRAF* ou *NRAS* e células normalmente presentes no microambiente tumoral, assim como a avaliação do comportamento e funcionalidade celular na presença ou ausência de fármacos validados para o tratamento de melanoma.

Esse trabalho se coloca como um passo inicial na determinação de uma metodologia que poderá, utilizando as células de pacientes, prever o comportamento da modulação do microambiente tumoral, com importante foco na célula tumoral, frente a utilização de fármacos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

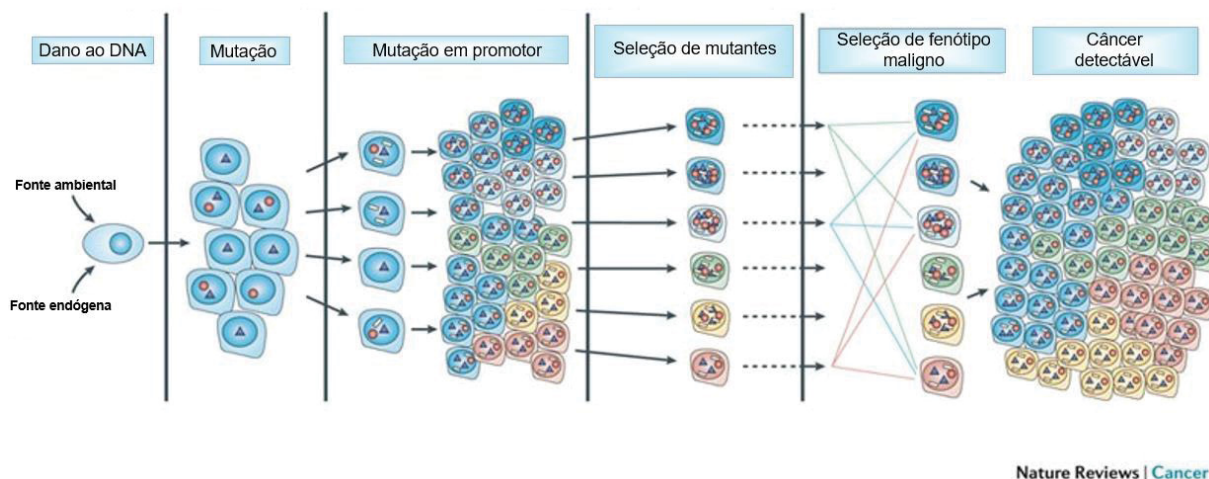
De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2020) o câncer é caracterizado como um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento exacerbado de células, que podem atingir tecidos adjacentes ou órgãos distantes (INCA, 2020). A célula cancerosa se diferencia das demais células por crescer na ausência de sinais de crescimento, ignorar sinais antiproliferativos ou de morte celular, invadir diferentes órgãos e tecidos em diversas áreas do corpo, criar seus próprios sinais angiogênicos, driblar a ação do sistema imune, modificar células do sistema imune para auxiliar a progressão tumoral, acumular indiscriminadamente alterações no seu material genético e metabolizar diferencialmente os nutrientes (National Institutes of Health, NIH, 2021). Além disso, Hanahan (2022) traz aspectos emergentes que devem ser considerados no entendimento da célula tumoral e do seu microambiente, que são o desbloqueio da plasticidade fenotípica realizando bloqueio ou transdiferenciação, reprogramação epigenética, microbioma polimórfico composto por diversos microrganismos que podem estar relacionados com diversas características da progressão tumoral e modulação nas células senescentes do microambiente tumoral.

De acordo com a última estimativa realizada pelo Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) para o ano de 2020 foram estimados mais de 18 milhões de casos de câncer no mundo (excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), estimando ainda quase 10 milhões de mortes pela doença no mesmo ano (SUNG et al., 2021). No ano de 2020, somando homens e mulheres, houve um total de mais de 225 mil casos de morte por neoplasias no Brasil, causados principalmente por câncer de mama, traqueia, brônquios e pulmões, próstata, cólon e reto. Segundo DATASUS (BRASIL, 2022), foram diagnosticados entre janeiro e julho de 2022 quase 180 mil novos casos de câncer no Brasil, quase mil casos diários (INCA, 2020).

O câncer pode surgir em qualquer tecido do corpo e no primeiro lugar em que se inicia é denominado tumor primário (CACHO-DIAZ et al., 2020). Esse início pode ser causado por fatores diversos para cada tipo de câncer, como por exemplo o tabagismo pode estar associado ao câncer de pulmão (AREDO et al., 2021), a

exposição à luz UV com câncer de pele (KE; WANG, 2021) e fatores genéticos com câncer de pâncreas (KLEIN, 2021), mas em todos os casos, sua progressão se dá por um acúmulo sequencial de mutações (Figura 1) (LOEB, 2011).

Figura 1 - Acúmulo sequencial de mutações



Fonte: Traduzido de LOEB (2011)

Dentre os diversos tipos de câncer alguns se destacam por apresentar alta prevalência, mortalidade e recidiva, como os cânceres de pulmão, mama, fígado e câncer de pele do tipo melanoma.

2.1.1 MELANOMA

O melanoma é um dos muitos tipos de cânceres de pele. Todos se iniciam por divisões exacerbadas de células presentes na pele, e são classificados como melanoma e não melanoma. De acordo com o INCA (2022) os cânceres de pele do tipo não melanoma são os mais recorrentes no Brasil e representam 30% do total de tumores malignos registrados no país, mas por apresentar alta percentual de cura quando diagnosticado precocemente, possui baixa taxa de letalidade. Já o do tipo melanoma ocorre por altera es nas células denominadas melanócitos, presentes no estrato basal da epiderme e que são responsáveis pela produção de melanina (CICHOREK et al., 2013). Apesar de não apresentar uma alta incidência mundial, sendo representado por 1,7% dos diagnósticos de câncer no mundo, o número de casos cresceu cerca de 320% nos Estados Unidos desde 1975. Estimativas demonstram que em 2020 houve 325.000 novos casos de melanoma no mundo e

cerca de 57.000 mortes pela doença (FERLAY et al., 2021; SAGINALA et al., 2021). Já no Brasil, para o mesmo ano, o INCA (2022) estimou 8.450 novos casos da doença e cerca de 1.923 mortes.

Diversos fatores de risco estão associados com o surgimento do melanoma. Estudos indicam que fatores preveníveis como bronzear artificial (GHIASVAND et al., SEOKYUNG AN et al., 2021) e exposição a luz UV (SAMPLE; HE, 2018) e fatores não preveníveis como fatores genéticos, idade e cor da pele são aspectos de risco para o melanoma (CARR; SMITH, WERNBERG, 2019).

O melanoma é conhecido por apresentar a maior taxa de mutações entre todos os tipos de câncer humano (ALEXANDROV et al., 2013; HAYWARD et al., 2017), e sua progressão se dá pelo acúmulo sequencial de diversas alterações genéticas, com mutações específicas ocorrendo em momentos chave, desde o nevo benigno até a fase metastática, com a inativação de genes de supressão tumoral, exacerbando o crescimento do tumor. Estudos genômicos, além de expor a importância das mutações na progressão do melanoma, também sugerem que a doença possui uma alta assinatura mutacional relacionada a radiação UV, relacionando a prevalência do melanoma com fatores comportamentais, como exposição solar desprotegida (HAYWARD et al., 2017; JACKETT; SCOLYER, 2019). Tendo em vista essa variabilidade genética, AKBANI et al. (2015) mostraram, utilizando dados de 318 pacientes, que algumas mutações são específicas em determinados tipos de melanoma metastático humano. Nesse estudo foram determinados 4 diferentes subtipos de melanoma, baseados nos padrões de mutação, sendo eles *BRAF* mutante, presente em 52% das amostras, *RAS* mutante, presente em 28%, *NF-1* mutante, em 14% ou triplo negativo (não apresenta mutação nos três genes anteriores), em 14%. Vale ressaltar que em *BRAF*, o maior subtipo, 87% das mutações ocorrem no códon 600 do gene, sendo 2% V600R (substituição de dois nucleotídeos do códon por valinas), 10% V600K (substituição de uma lisina por uma valina) e 75% V600E (substituição de um ácido glutâmico por uma valina), tipo mais comum entre todas as mutações do melanoma (ASCIERTO et al., 2012). Estudos apontam que as mutações em *BRAF*, *NRAS* e *NF-1* estão associadas a fases iniciais da progressão da doença, enquanto *CDKN2A*, *PTEN* e *TP53* são importantes em fases mais avançadas da doença (SHAIN; BASTIAN, 2016). Ainda assim, estudo clínico utilizando 274 amostras de tecido de melanoma de pacientes, demonstrou que

em 47% das amostras apresentavam mutação em *BRAF* tanto no tumor primário, quanto no metastático, demonstrando a complexidade genética do tecido tumoral (SINI, et al., 2018).

As mutações modificam a taxa de síntese de determinadas proteínas, podendo alterar também a conformação de determinados polipeptídios (WOODBURY et al., 1980; KRAMER et al., 2016). Dessa forma, a alteração na síntese proteica leva a modificações em importantes vias metabólicas, relacionadas ao controle de proliferação (PATHRIA et al., 2016), resistência a apoptose (LI et al., 2019) e controle do ciclo celular (ZHANG et al., 2020). Sob condições fisiológicas normais, a via de sinalização MAPk é iniciada através de receptores para sinais extracelulares, que no interior da célula vão desencadear ações relacionadas a proliferação, adesão e sinalização celular (FECHER et al., 2008; PELUSO et al., 2019). É comum em células tumorais, especialmente no melanoma, que algumas das proteínas reguladoras dessa via sejam modificados por mutações em seus genes, como é o caso da *BRAF* (Figura 2) (BHATIA et al., 2015; TAS; ERTURK, 2020), e da *RAS* (JENKINS; SULLIVAN, 2016). A proteína *BRAF* faz parte da família das proteínas transdutoras de sinais de crescimento mediadas por *RAF*, e quando mutada é constitutivamente expressa em sua forma ativada. Por se tratar de uma proteína reguladora da via MAPk, ela torna também essa via constitutiva (BHATIA et al., 2015; TAS; ERTURK, 2020). Já a proteína *RAS*, em condições normais, está ligada a um GDP. Em resposta a um estímulo extracelular, essa proteína passa a se ligar a GTP recrutando proteínas da família *RAF* para fosforilar proteínas *MEK*, que irão continuar a via de sinalização (SANTARPIA et al., 2012; LEE et al., 2020). Uma das proteínas responsáveis por regular essa via é a *NF-1*, que regula negativamente *RAS*, hidrolisando um dos fosfatos da *RAS*-GTP, tornando-a *RAS*-GDP (retorna a forma inativada, não desencadeando a via) (ALON et al., 2018). Mutações nos genes que codificam essas proteínas fazem com que elas sejam atuem (ou deixem de atuar, no caso de *NF-1*) sem a necessidade de estímulo extracelular e dessa forma a via MAPk que normalmente só é ativa na presença do estímulo, passa a estar ativa constitutivamente (PELUSO et al., 2019). Considerando sua função celular, essa atividade exacerbada contribui para a manutenção e prevalência da célula tumoral. A grande especificidade nas mutações dessas vias as torna um potencial mecanismo

Figura 2 - Mutações em vias de sinalização

de Breslow que define 5 níveis da invasão neoplásica em relação aos estratos da pele: Nível I - o tumor envolve somente a epiderme; Nível II - o tumor envolve a epiderme e parte da derme papilar; Nível III - o tumor preenche a derme papilar; Nível IV - o tumor envolve a derme reticular; e Nível V - o tumor invade as camadas de gordura da pele - a hipoderme. Essa mesma portaria traz as opções terapêuticas no tratamento da doença. Quando não metastático é preconizada a excisão local, mas quando metastático o tratamento se dá por terapia sistêmica (BRASIL, 2013). Além disso o relatório de recomendação da comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS (CONITEC) recomendou a incorporação de anti-PD1 (nivolumab e pembrolizumab) para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático (BRASIL, 2020).

1.1.1.1 TRATAMENTOS PARA O MELANOMA

Existe um longo histórico de tratamentos aprovados para o melanoma (Tabela 1). O primeiro, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) foi o quimioterápico dacarbazina que possui ação alquilante, interagindo com a molécula de DNA e impedindo a replicação celular. Contudo, possui baixa responsividade, apenas 5 anos de sobrevida em até 6% dos pacientes, além de causar diversos efeitos adversos pela sua ação sistêmica (KIM et al., 2010; DOMINGUES et al., 2018). Outro quimioterápico que pode ser utilizado é a temozolomida, mas que possui a mesma taxa de eficácia da dacarbazina.

Para além dos quimioterápicos, existem também os imunoterápicos que não focam diretamente na célula tumoral, mas sim nas células do sistema imunitário que invariavelmente estão presentes no tecido tumoral do melanoma. Tendo em vista essa característica, foram desenvolvidos imunoterápicos que possuem ação sobre essas células auxiliando-as a reconhecer células tumorais. Dentre esses destacam-se as citocinas exógenas como IFN- α , que atuam na ativação de linfócitos, células dendríticas e NK (*natural killer*) (ACHKAR; TARHINI, 2017). Interleucinas, também são citocinas que atuam sobre o aumento da atividade de linfócitos T (BUCHBINDER et al., 2019). Um importante tipo é a IL-2, que é um fator de crescimento para linfócitos T CD8+, conhecidos por ter alta atividade antitumoral em melanoma (ATKINS et al., 1999; DAVAR et al., 2017). A grande problemática dessas é que sua atividade se torna

sistêmica, causando diversos efeitos colaterais, assim como as quimioterapias (KROSCINSKY et al., 2017), além de que em alguns casos os imunoterápicos não possuem efeito ou apenas freiam momentaneamente a progressão tumoral, além de depender de um ambiente imunológico favorável, com alta infiltração de células do sistema imune (DOMINGUES et al., 2018). Os inibidores de controle imunológico também são utilizados sobre as células do sistema imunitário. Esses inibidores englobam uma série de moléculas que atuam na ativação ou inativação da ação do sistema imunitário em todo o corpo, incluindo o tecido tumoral (BENCI et al., 2016). Uma dessas moléculas é a PD-1. Quando PD-1 encontra seu ligante (PD-L1) na superfície de outra célula é transmitido sinal para que o linfócito T não atue sobre aquela célula. A célula tumoral utiliza essa característica, passa a expressar PD-L1 em sua superfície e assim consegue evitar a ação dos linfócitos T (CARBOGNIN et al., 2015). Considerando esse mecanismo, foram desenvolvidos inibidores de PD-1 (pembrolizumab e nivolumab) e inibidores do ligante PD-L1 (atezolizumab, avelumab, durvalumab) (MAHONEY et al., 2015; ZUBIRI et al., 2019). Além da PD-1, uma proteína associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) também é um dos alvos moleculares explorados. Esse é um receptor presente na membrana dos linfócitos T que age competindo com o receptor CD28 pela ligação com as proteínas B7.1 e B7.2, que são expressas por células apresentadoras de antígeno. A ligação de B7.1 e B7.2 ao CD28 é um dos passos necessários para que seja desencadeada a resposta imune mediada por linfócito T. Consequentemente, caso os ligantes interajam com CTLA-4, há declínio da resposta imune e anergia do linfócito T (ARIYAN et al., 2018; HOSSEINIA et al., 2020). Assim, foram desenvolvidos os anticorpos anti CTLA-4 Tremelimumab e Ipilimumab como agentes que bloqueiam a ligação do CTLA-4 aos seus ligantes (EGGERMONT et al., 2010; MASTRACCI et al., 2020). Muitos dos avanços utilizando as células do sistema imunitário vêm de encontro com técnicas de terapia celular adotiva (ACT). Nessa são coletadas células do sistema imunitário do paciente – usualmente linfócitos T – para sensibilização e posterior reintrodução no paciente. Essas células, em teoria, teriam uma maior eficiência no reconhecimento e eliminação de tumores. Esse atua como uma imunoterapia mediada por células (e não por fármacos) e seu estudo pode ser realizado *in vitro* utilizando plataformas microfluídicas (ADRIANI et al., 2016).

Tabela 1 - Histórico dos principais tratamentos para melanoma

Agente	Mecanismo	Tipo	Indicação	Ano
Dacarbazina	Agente alquilante	Quimioterapia	Melanoma metastático	1975
IL-2	Citocina	Imunoterapia	Melanoma metastático	1998
IFN-alfa-2b	Citocina	Imunoterapia	Terapia adjuvante para melanoma com alto risco de recorrência	1995
T-VEC	Vírus oncolítico	Imunoterapia	Tratamento local de melanoma cutâneo ou subcutâneo em pacientes com recorrência após cirurgia	2015
Vemurafenib	Inibidor de BRAF	Terapia alvo	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2011
Cobimetinib	Inibidor de MEK	Terapia alvo	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2015
Dabrafenib	Inibidor de BRAF	Terapia alvo	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2013
Trametinib	Inibidor de MEK	Terapia alvo	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2013
Dabrafenib + trametinib	Inibidor de BRAF + Inibidor de MEK	Terapia alvo	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K Adjuvante no tratamento de melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2015
Vemurafenib + cobimetinib	Inibidor de BRAF + Inibidor de MEK	Terapia alvo	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2015
Encorafenib + binimetinib	Inibidor de BRAF + Inibidor de MEK	Terapia alvo	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2018
Ipilimumab	Anticorpo Anti-CTLA-4	Imunoterapia	Melanoma metastático/irressecável	2011
Nivolumab	Anticorpo Anti-PD-1	Imunoterapia	Melanoma metastático/irressecável	2014
Pembrolizumab	Anticorpo Anti-PD-1	Imunoterapia	Melanoma metastático/irressecável	2014
Nivolumab + ipilimumab	Anticorpos Anti-CTLA-4 + anti-PD-1	Imunoterapia	Melanoma metastático/irressecável	2015
Atezolimumab + vemurafenib + cobimetinib	Anticorpo Anti-PD-L1 + Inibidor de BRAF + Inibidor de MEK	Terapia combinada	Melanoma metastático/irressecável com mutação do tipo BRAF V600E/K	2020

Fonte: traduzido de Guo; Wang; Li, 2021.

Outra linha de tratamento é a utilização de terapias alvo, que são moléculas capazes de atuar em algumas vias específicas das células tumorais. O principal diferencial das terapias alvo é justamente a capacidade dessas moléculas de exercerem efeitos sobre as células tumorais, sem apresentar os efeitos sistêmicos muitas vezes vistos nas outras classes de tratamentos. De forma geral, as terapias alvo focam em proteínas formadas a partir de genes mutados, característica encontrada mais especificamente na célula tumoral. Como visto anteriormente, a mutação no gene *BRAF* é altamente prevalente no melanoma. Por isso uma das principais classes de terapias alvo é a de inibidores de BRAF, com uso de fármacos como Vemurafenib que causa a fosforilação da proteína BRAF V600E, inibindo a continuação da via de sinalização (SHARMA et al., 2012), e que demonstrou remissão nas metástases de melanoma de 50% dos pacientes com esse exato tipo de mutação (QUEIROLO, P.; SPAGNOLO, 2017; MANZANO, et al., 2016 OLBRYT, 2019). Outro tipo de terapia alvo integra os inibidores de MEK, como o Trametinib, inibidor competitivo de MEK1 e 2 e o Cobimetinib, inibidor altamente seletivo de MEK1 e que em estudos clínicos demonstrou ação sobre 68% dos pacientes (GRIMALDI, et al., 2017; SARKISIAN; DAVAR, 2018). A grande problemática das terapias alvo é que, com o passar do tratamento os pacientes passam a apresentar resistência aos fármacos. Por exemplo, tratamentos com uso de inibidores de BRAF, ao longo do

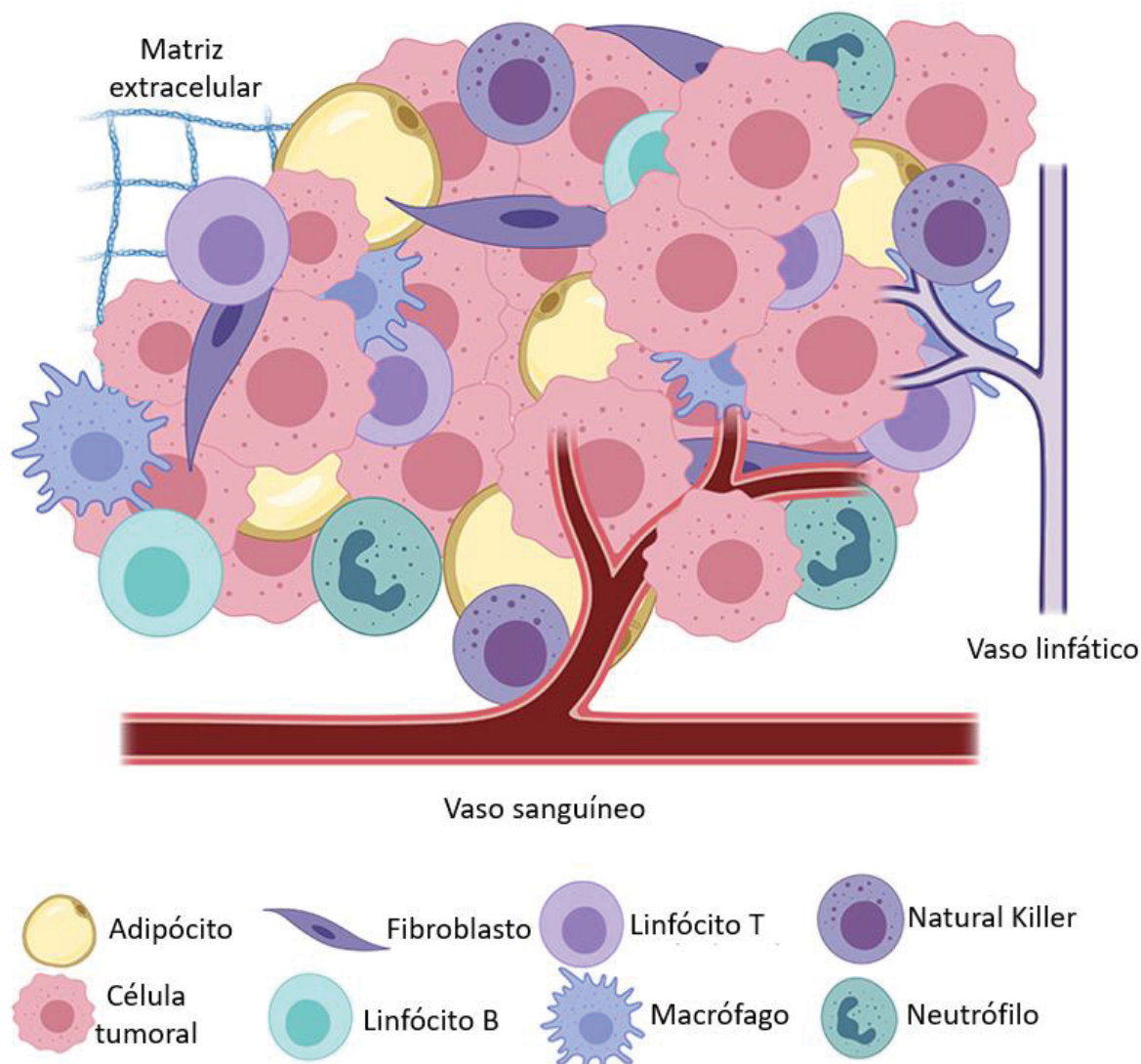
tempo, fazem com que a célula tumoral encontre vias alternativas para ativar a via MAPk, utilizando isoformas da proteína RAF (como a CRAF) (KOZAR, et al., 2019), demonstrando que, mesmo com todas as novas abordagens, ainda se faz necessária a busca por tratamentos eficientes para a doença.

Apesar de todas essas possibilidades terapêuticas, além de não recomendar a utilização de vemurafenib ou ipilimumab, no Brasil o uso da dacarbazina ainda é o principal meio de tratamento para melanoma metastático no SUS (BRASIL, 2013). Apenas recentemente houve a autorização para incorporar ao SUS os imunoterápicos anti-PD1 nivolumab e pembrolizumab na lista de fármacos de primeira linha para melanoma não cirúrgico metastático, com prazo de implementação até janeiro de 2021, demonstrando avanço na adoção de novos fármacos que focam diretamente na célula tumoral, mas sim em seu microambiente (BRASIL, 2020).

2.1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

Além das células tumorais, originadas através de mutações em células normais, diversos outros tipos celulares são encontrados em um tumor e, juntos, compõe o microambiente tumoral (Figura 3). Dentre esses componentes celulares encontrados no microambiente estão as células endoteliais. Células tumorais, em especial as de melanoma, são capazes de expressar fatores pró angiogênicos, como TGF- β e VEGF, fazendo com que haja migração de células endoteliais para o tecido tumoral, favorecendo a formação de novos vasos e consequentemente aumentando a chegada de nutrientes e trocas gasosas necessárias para a expansão do tecido tumoral (ARNETH et al., 2019; YUAN et al., 2022; BU et al., 2022).

Figura 3 - Representação do microambiente tumoral



Fonte: Traduzido de Langsten et al (2019).

Quando em um tecido normal, os melanócitos mantêm-se intimamente relacionados com queratinócitos através de estruturas de adesão célula-célula mediadas por E-caderina. Essa adesão auxilia no controle da taxa de proliferação de melanócitos. No melanoma, ocorre a inibição da expressão de E-caderina, e indução de expressão de N-caderina, passando a se comunicar entre si e com fibroblastos, perdendo a regulação celular e iniciando a progressão tumoral. Estudos de cocultura demonstraram que, quando na presença de queratinócitos, células de melanoma tendem a expressar menos N-caderina, demonstrando diminuição no fenótipo metastático (HSU et al., 2000; CHUNG et al., 2018). Essa interação através de N-caderina está associada com a indução de expressão de SDF-1 α e FSP-1 pelo fibroblasto, moléculas associadas ao crescimento e progressão do tecido tumoral e

que as células de melanoma não são capazes de expressar (XING; SAIDOU; WATABE, 2011; MAZURKIEWICZ et al., 2020; FUGIMURA, 2022). Sendo assim, esse auxílio dos fibroblastos à progressão tumoral é que faz com que eles sejam denominados fibroblastos associados ao câncer (CAFs – do inglês *cancer-associated fibroblasts*) (ZHANG et al., 2022). Eles ainda contribuem ativamente para a progressão tumoral, uma vez que a modificação nos padrões da matriz extracelular (MEC) causada pelos fibroblastos altera a forma de comunicação das células tumorais, consequentemente alterando seu comportamento. Por exemplo, quando a MEC está mais densa a célula tumoral tende a fazer menos interações célula-célula, sendo esse um dos fatores que desencadeia a progressão para metástase (TSANG et al., 2020).

Outra importante classe de células presentes no microambiente tumoral é a de células imunitárias. Devido à alta taxa mutacional, o melanoma maligno é um dos tumores mais imunogênicos, com grande presença de células como linfócitos T, NK, células dendríticas e macrófagos infiltrados no microambiente tumoral. Em condições normais, espera-se que a presença dessas células gere resposta imune e, consequentemente, o tumor seja facilmente eliminado. Contudo, o mesmo fator que o torna altamente imunogênico auxilia o escape do sistema imunitário. A alta plasticidade fenotípica faz com que haja seleção das células tumorais capazes de driblar a ação do sistema imune, por expressar receptores que diminuem a ação de células imunitárias por exemplo, tornando os imunoterápicos menos responsivos com o tempo (YAN et al., 2019; MARZAGALLIA; EBELTB; MANUEL, 2019).

Os macrófagos desempenham papel importante no microambiente, sendo denominados macrófagos associados ao tumor (TAMs). Geralmente são polarizados em uma classe denominada M2 que, diferente da polarização clássica em M1, possui atividade anti-inflamatória e estimula o crescimento tecidual, atuando também como fator pró angiogênico (JAROSZ-BIEJ et al., 2018; GUO et al., 2020; ANDERSON; SIMON, 2020). Essa polarização dos TAMs é altamente regulada por citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e diversos outros fatores. Dentre todos esses fatores, o fator estimulante de colônia 1 (CSF-1) e o ligante 2 de quimiocina CC (CCL2) estão diretamente relacionados com a progressão tumoral. A inibição da interação entre CCL2 e seu receptor diminui o número de focos metastáticos e aumenta a sobrevida de camundongos com tumores. Já CSF-1, quando expresso no

microambiente tumoral, está relacionado com progressão tumoral e metástase. Os TAMs podem ser correlacionados a todas as fases da progressão tumoral, incluindo invasão (com a secreção de diversas enzimas proteolíticas como catepsinas, metalloproteinases - MMP7, MMP2 e MMP9 - e serino proteinases), a liberação de fatores angiogênicos para a vascularização tumoral (produção de VEGF, fator de crescimento de fibroblastos 2 - FGF-2, IL-1, IL-8 e óxido nítrico) e a sobrevivência na circulação sanguínea (pela estimulação da via de sinalização de sobrevivência PI3K / Akt, preservando a célula tumoral da ação de citocinas pró apoptóticas) (LIN; XU; LAN, 2019). Toda essa complexa relação vista entre células tumorais e outras células do microambiente tumoral podem ser mimetizadas utilizando técnicas de cultivo, principalmente tridimensionais.

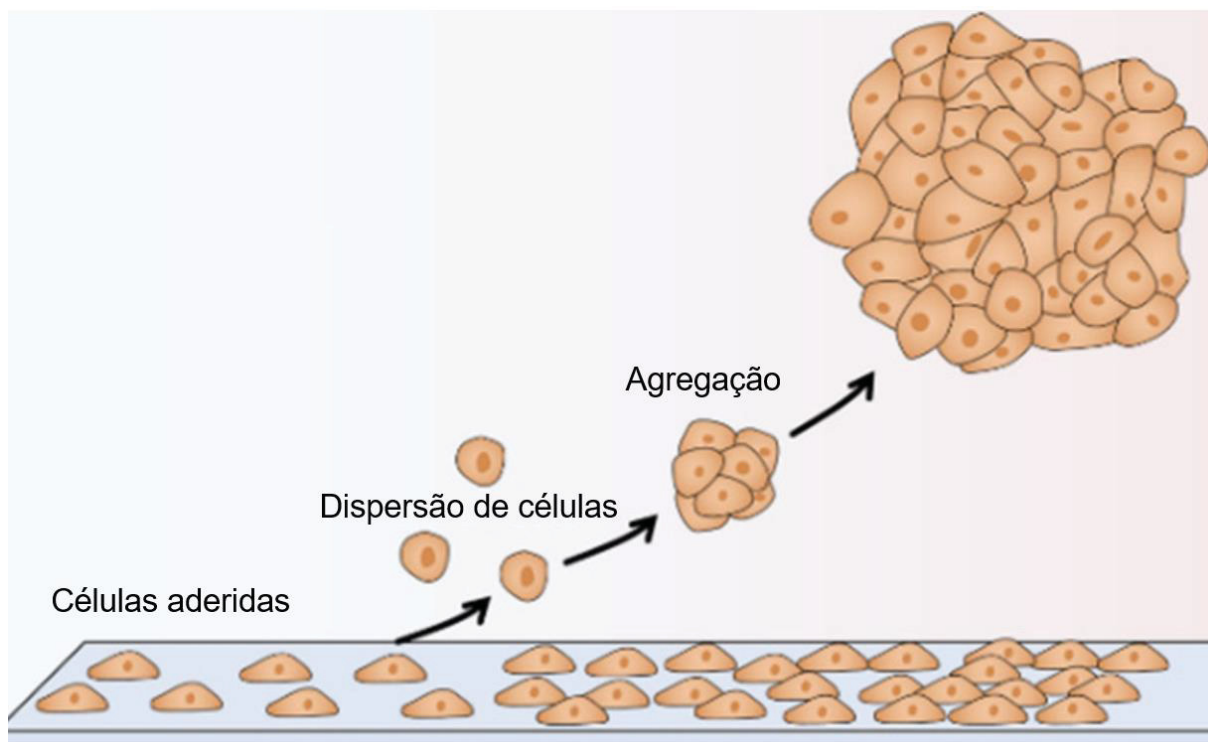
2.1.3 CULTIVO TRIDIMENSIONAL

As técnicas de cultivo celular são, há muitas décadas, a principal forma de estudo de compostos com possíveis ações biológicas. Elas são uma forma de triar os compostos antes de chegar na fase *in vivo* com modelos animais (KAPALCZYŃSKA et al., 2018; IPEK; ÜSTÜNDAĞ; EKE, 2022). A maior crítica que se tem aos modelos de cultivo celular é a falta de proximidade estrutural com os tecidos e por isso, foram desenvolvidas e vem se popularizando técnicas de cultivo tridimensional (3D) (Figura 4). Por representar melhor os padrões metabólicos e bioquímicos encontrados nos tecidos, os modelos de cultivo 3D tendem a possuir maior acurácia, quando comparado com o encontrado em pacientes (MILLARD et al., 2017). Estudos demonstram que vias de sinalização importantes como AKT-mTOR-S6K (RIEDL et al., 2018), e RAS/RAF/MEK/ERK (POTU et al, 2017), relacionadas à morte celular e proliferação, respectivamente, apresentam modificações quando comparadas as técnicas de cultivo 2D e 3D, demonstrando que modelos 3D apresentam maior rigor espacial e molecular semelhante aos sistemas *in vivo* (EDMONDSON et al., 2014).

Esferoides são estruturas 3D celulares geralmente esféricas, que podem ser obtidas por diferentes métodos e que mimetizam a organização espacial das células. No contexto do câncer, os esferoides apresentam diversas vantagens por possuírem padrões de gradiente de penetração de compostos como hidrogênio, oxigênio, além de nutrientes, muito semelhantes ao de tumores *in vivo* (HIRT et al., 2014;

BOURLAND; FRADETTE; AUGER, 2018). A falta de oxigênio, por exemplo, contribui para que a célula tumoral obtenha energia através do metabolismo anaeróbico, promovendo ainda a modificação na acidificação intratumoral. Esse mesmo padrão se repete em esferoides, demonstrando a validade do modelo (NUNES et al., 2018).

Figura 4 - Cultivo 2D para cultivo 3D



Fonte Traduzido de Grimm et al (2022).

Dentre os métodos de obtenção de estruturas tridimensionais existem os independentes de ancoragem, que culminam na formação de esferoides. Esse consiste na auto agregação das células quando semeadas sob superfícies inertes, que impedem sua adesão célula-matriz. Em geral, utilizam-se 3 técnicas para se obter estruturas 3D no método independente de ancoragem: (1) O *hanging drop*, onde a agregação das células ocorre quando a superfície não está disponível para adesão celular. Nesse método são utilizadas pequenas gotas suspensas contendo a dispersão de células. A gota deve ser grande o suficiente para que as células se agreguem sem interagir com o material de suporte (placa de Petri, por exemplo), mas pequenas o suficiente para que não haja agregação das gotas ou deslocamento durante o manuseio (HOFSCHROËR et al., 2017; LANGHANS, 2018); (2) o

crescimento em matriz de baixa adesão é outro método que pode ser utilizado. Nele as células são depositadas sobre uma matriz que não permite a adesão celular, forçando as células a interagirem entre si (CUI et al., 2017). Para isso pode ser utilizada placa de cultivo comercialmente construída para impedir adesão e favorecer o encontro das células (IESSI et al., 2017) ou utilizar matrizes de ágar (THURBER et al., 2011; BEAUMONT et al., 2015) ou sua fração, a agarose (ZHANG et al., 2015) em placas de cultivo próprias para adesão células; (3) a levitação magnética, onde são adicionadas nanopartículas magnéticas à dispersão de células. Com a utilização de ímãs sobre e sob placas de cultivo, a força magnética faz com que as células se aproximem entre si e longe da interface com o plástico. Com isso as células tendem a formar interações entre si. Contudo esse acaba sendo um método de custo elevado, comparado a outros, dificultando sua utilização em muitos estudos (DABBAGH et al., 2022).

Além desses existem modelos que utilizam plataformas para o crescimento celular, onde as células crescem imersas ou em suportes. Uma das metodologias utilizadas nesse modelo é a formação de colônias. Nessa, as células estão embebidas em uma matriz gelatinosa, que simula a MEC. Essa matriz pode ser composta de diversos materiais, como matrigel (WESSELS et al., 2017; QIAN et al., 2020) ou, mais comumente, *soft* ágar (SKOBOWIAT et al., 2017; SWEENEY et al., 2018; RAINERI et al., 2019). Modelos utilizando hidrogéis, como de polietilenoglicol (PEG) (LEIGHTA et al., 2015) e fibras orgânicas (REIS et al., 2017) também são exemplos desse tipo de cultivo 3D. Existe também o modelo que consiste na utilização de *beads* comerciais que são revestidas pelas células e que, a partir disso forma a estrutura 3D (LIU et al., 2020). Ainda dentre esse tipo de modelo existem as nanofibras, que atuam como um suporte tridimensional para o crescimento das células. Diversos polímeros naturais ou sintéticos podem ser utilizados para formação das nanofibras (SELL et al., 2010; MANEA et al., 2016; JUN et al., 2018), incluindo base para o desenvolvimento de modelo 3D para estudo *in vitro* de melanoma (WANG et al., 2017; GONÇALVES et al., 2020). Considerando que compostos naturais podem liberar moléculas que poderão interferir no estudo (à exemplo do matrigel) resultando em um conjunto de dados de difícil análise, a utilização de compostos inorgânicos ou polímeros inorgânicos inertes (KAZANTSEVA et al., 2018) em escala micro e nanométrica pode ser utilizada por possuir semelhança com a estrutura fibrilar da MEC sem interferir

diretamente em padrões moleculares. Para isso diversos materiais como a polianilina (PRATHAP et al., 2018), grafeno (KAZANTSEVA et al., 2018) e compostos metálicos (SAHA et al., 2014) podem ser usados tanto como matriz de suporte quanto em sistemas para entrega de fármacos (GOYAL et al., ZHU et al., 2019).

Outras metodologias estão associadas a dispositivos microfluídicos. Esses são pequenas plataformas desenvolvidas através da utilização de materiais diversos, onde é possível criar diminutos canais que se ligam a câmaras. Dependendo da necessidade do estudo é possível adicionar diferentes células ao dispositivo, além de manter um fluxo constante de chegada de nutrientes, assim como visto em tumores *in vivo* (AREF et al., 2018). Estudo recente demonstrou a utilização de dispositivos microfluídicos com a adição de uma matriz de nanofibras. No dispositivo, foi observada formação de estruturas 3D celulares e foi realizado monitoramento temporal dos padrões metabólicos das células por 14 dias (KIM et al., 2019).

2.1.3.1 MODELOS MULTICELULARES EM COCULTURA

A obtenção *in vitro* de equivalentes teciduais para o estudo da progressão de tumores é extremamente desejável. Hoje em dia, utilizando técnicas de cultivo 3D, já é possível obter a estratificação da pele, em modelo de pele equivalente que utiliza diversas células, como queratinócitos, fibroblastos e melanócitos, além de componentes da MEC. Nesse modelo é possível introduzir células tumorais, como as de melanoma, para avaliar a progressão e comportamento do tumor (HILL et al., 2015; SALTARI et al., 2016; HARIDAS et al., 2018; MÜLLER; KULLMS, 2018). Contudo a variabilidade celular, o tempo de cultivo, o custo total e a elevada manutenção da estrutura formada, tornam esse modelo muito complexo para diversos tipos de estudo, inviabilizando sua utilização em larga escala. Tendo em vista isso, utilizam-se em geral modelos mais simplificados para a análise 3D das células de melanoma, como os esferoides por exemplo. Kuen (2017) demonstrou a criação de estruturas 3D utilizando diversas linhagens de células de câncer pancreático associadas à fibroblastos. No mesmo sentido Shoval et al. (2017) avaliaram que estruturas 3D com diversas linhagens de células de melanoma associadas a células endoteliais apresentam estruturas que se assemelham a pequenos e simplificados vasos sanguíneos.

As diversas interações entre células tumorais e células do sistema imunitário apresentam importante papel no avanço tumoral e no controle da sua progressão (PIENIAZEK; MATKOWSKI; DONIZY, 2018), sendo assim, a incorporação de coculturas no modelo 3D em estudos de compostos com possível ação antitumoral precisa levar em consideração a presença e ação do sistema imunitário no microambiente tumoral. Assim, modelos 3D multicelulares que utilizam essas células em conjunto têm um maior poder de precisão, por levar em consideração não só o contato diferencial célula-célula como também a expressão diferencial de diversas moléculas para o meio extracelular (MENGUS et al., 2017; XIN et al., 2019). Ainda dentre os modelos multicelulares, um estudo apresentou um modelo para produção de estrutura 3D de células de câncer urotelial em cocultura com monócitos da linhagem THP-1, utilizando uma placa comercial, no método de matriz de baixa adesão (MIYAKE et al., 2016). Long, Yin e Min (2018) utilizaram macrófagos extraídos de tumores de camundongos e cocultivaram com células câncer de ovário para formação de estrutura 3D para auxiliar a compreensão do papel dos macrófagos na metástase da doença. O Modelo utilizando células tumorais, fibroblastos e macrófagos demonstrou polarização em M2 quando em cocultura (KUEN et al., 2017). Outro modelo 3D, utilizando células de câncer de pulmão, monócitos e fibroblastos demonstrou expressivo aumento na expressão de citocinas e metaloproteinases, quando comparado com monocultura (REBELO et al., 2018).

Outros tipos celulares também presentes no microambiente tumoral são as células NK e os linfócitos T. Um estudo utilizando cocultura de células de melanoma com NKs demonstrou alteração na expressão de diversos receptores de membrana da célula do sistema imunitário relacionados com a ação citotóxica antitumoral (PIETRA et al., 2012), demonstrando a importância de se utilizar modelos multicelulares. Votanopoulos et al. (2019) demonstraram que é possível obter um modelo multicelular utilizando células de melanoma, linfócitos T e células apresentadoras de antígeno (provenientes de linfonodos) utilizando amostras extraídas de pacientes, para o estudo de resposta à imunoterápicos. Porém, estudos com modelos tridimensionais tumorais incluindo células do sistema imune são relativamente complexos, e sendo assim, devem ser desenvolvidos e melhorados a fim de implementar modelos *in vitro* que melhor representem os modelos *in vivo*.

2.2 MEDICINA DE PRECISÃO

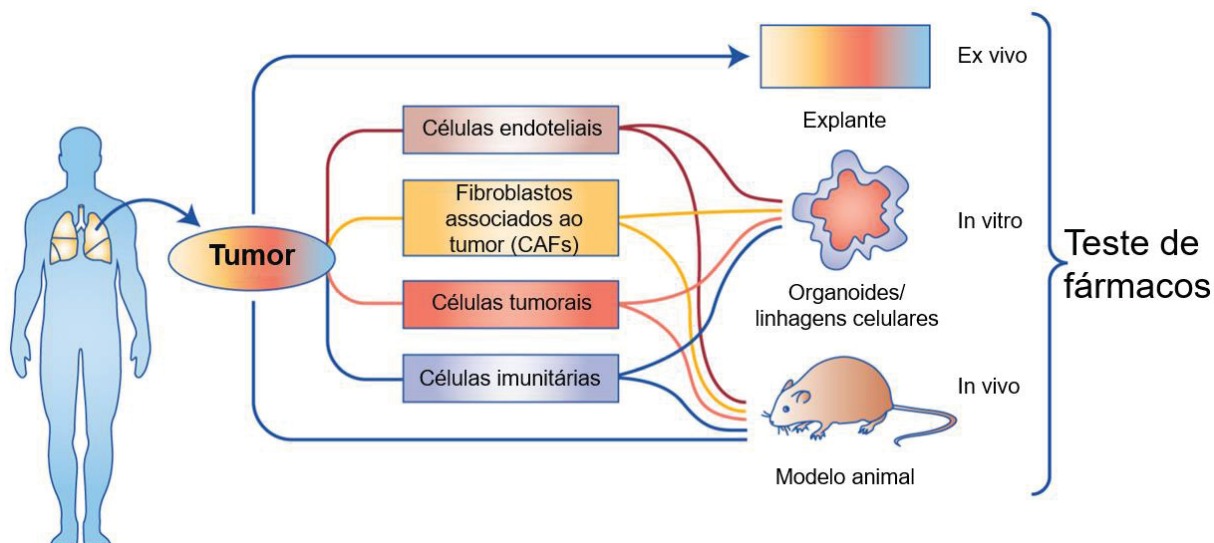
O desenvolvimento de tratamentos mais eficazes assim como melhor direcionamento dos fármacos disponíveis se faz necessário. No caso do câncer, onde a mesma doença possui diversas nuances genotípicas e fenotípicas, o uso da medicina de precisão pode melhorar o prognóstico, diminuir o tempo de tratamento e consequentemente os efeitos colaterais associados a ele (MUKHERJEE, 2019; MALONE et al., 2020).

A medicina de precisão nada mais é do que o emprego de ferramentas de análise genômica, ambiental e comportamental dos indivíduos com determinadas doenças para determinar qual fármaco, num conjunto de compostos, poderá ter o melhor efeito para ele. Essas ferramentas podem se basear em análises de bioinformática, bases de dados, análise de mutações ou testes *in vitro*, por exemplo. Uma vez que a medicina de precisão leva em consideração características individuais na adoção da melhor abordagem terapêutica, o emprego de técnicas de estudo *in vitro* utilizando células do próprio paciente no teste de tratamentos possibilita seu desenvolvimento (PAULI et al., 2017; PRENDERGAST; BURDICK, 2019).

Em 2020 o governo federal lançou, por meio do ministério da saúde, o Programa Nacional de Genômica e Saúde de Precisão. Por meio desse programa, visa-se investir na análise genômica da população brasileira, ao criar um banco de dados nacional com 100 mil genomas completos de pessoas com doenças raras, cardíacas e câncer, por exemplo.

Para a aplicação efetiva da medicina personalizada, diversas técnicas necessitam ser utilizadas e aprimoradas. Uma das possibilidades é cultivar em laboratório o tecido tumoral de pacientes e, utilizando técnicas de cultivo bidimensional ou tridimensional, avaliar o comportamento de fármacos para que seja determinado o melhor para aquele paciente (Figura 5).

Figura 5 - Exemplo da aplicação da medicina de precisão



Fonte: Traduzido de Powley et al (2020)

Estudos já trouxeram tal abordagem na obtenção de esferoides de metástase pulmonar (KIM et al., 2021; AZIZIPOUR et al., 2022), melanoma (JEONG et al., 2021), câncer colorretal (XIA et al., 2021) e de pâncreas (KAUR et al., 2021). Contudo, para que tais estudos possam ser feitos, trabalhos iniciais, muitas vezes utilizando células de linhagens, são necessários, de forma a determinar métodos antes de se utilizar células de pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Este trabalho tem como objetivo obter e padronizar modelos tridimensionais *in vitro* de melanoma humano, assim como modelo de cocultura incluindo célula do sistema imunitário, e avaliar o comportamento celular e funcionalidade do modelo na presença ou ausência de fármacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a obtenção de modelo tridimensional de células de linhagens de melanoma humano portadoras ou não de mutação em *BRAF*, *NRAS* e *NF-1*;
- Desenvolver modelos tridimensionais multicelulares de células de linhagens de melanoma humano portadoras ou não de mutação em *BRAF*, *NRAS* e *NF-1* em cocultura com células do sistema imunitário (monócitos/macrófagos);
- Comparar a eficiência de formação de esferoides utilizando técnicas independentes ou dependentes de suporte a partir de avaliação morfológica;
- Avaliar características morfológicas nos modelos desenvolvidos utilizando microscopia de luz;
- Analisar a representatividade dos modelos obtidos frente à exposição a fármacos-referência para o tratamento do melanoma humano.

4 Materiais e Métodos

4.1 Cultivo Celular

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes linhagens celulares de melanoma humanas: Sk-Mel 28 (ATCC® HTB-72), Sk-Mel 147 (RRID:CVCL_3876), MeWo (ATCC® HTB-65) e CHL-1 (ATCC® CRL-9446TM) modelos representativos da classificação genética do melanoma com mutação em *BRAF*, *N-RAS*, *NF-1* e triplo negativa, respectivamente, e THP-1 (ATCC® TIB-202TM), linhagem monocítica, as quais foram mantidas em meio de cultivo celular específico conforme protocolos padrão da ATCC. A célula Sk-Mel 28 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro; MeWo, CHL-1 e Sk-Mel 147 foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Roger Chammas, do Laboratório de Oncologia Experimental, ICESP/USP; e THP-1 foi gentilmente cedida pela Professora Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

As células de melanoma foram cultivadas seguindo protocolo da *American Type Culture Collection* (ATCC), onde as células são mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco, cat. 12657) contendo 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma, cat. S8761) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, cat. 12657), 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina (Gibco, cat. 15140-48). Essas foram mantidas em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ e subcultivadas, seguindo protocolo da ATCC, quando a confluência chegava a 70-80%. Já a THP-1 foi cultivada em meio DMEM (Sigma cat. D6429-1L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, cat. 12657) inativado a 56 °C, 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina (Gibco, cat. 15140-48). Por ser uma célula não aderente, o subcultivo ocorreu quando a confluência chegava a 8 x 10⁵ células/mL. Células foram mantidas em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Todas as células foram utilizadas até a quinta passagem, considerando o descongelamento das células estoque como passagem 0.

As células, cedidas por laboratórios referência no Brasil ou adquiridas do BCRJ (células estoque) foram mantidas em estoque sempre em passagem baixa para

garantir a validação das linhagens (congeladas em no máximo 3 passagens a partir de sua obtenção original). Além disso a observação constante da morfologia, tempo de dobramento, assim como resultados como o da avaliação da IC₅₀ nos indicam que tais linhagens estão se comportando de modo esperado em relação a seus padrões.

4.2 Inibidores

Foram utilizados dois inibidores do tipo terapia-alvo, vemurafenib (PLX4032; MCE, cat. HY-12057) (inibidor competitivo da proteína BRAF mutada, em especial com a mutação do tipo V600E) e cobimetinib (RG7420; MCE, cat. HY-13064) (inibidor reversível da atividade catalítica de MEK1/2), ambos com alvos em proteínas da via MAP quinase. Ambos foram dissolvidos em DMSO (Sigma, D2438) nas concentrações de 10 mM (cobimetinib) e 20 mM (vemurafenib) e mantidos congelados em alíquotas à -80 °C até o momento do uso. Para exposição às células foram diluídos em meio de cultivo DMEM com SFB na concentração indicada em cada experimento.

4.3 Determinação de concentração inibitória média (IC₅₀) de proliferação celular

Para determinação da IC₅₀ de cada linhagem, as células de melanoma humano em monocultura foram semeadas em placas de 96 poços (Sarstedt, ref. 83.3924) (nas seguintes densidades: Sk-Mel 28: 900, MeWo: 1000, CHL-1: 1450 e sK-Mel 147: 4000 células por poço, de forma que, ao final das 72 horas de experimento, todos controles possuíssem uma monocamada de células) e expostas a 8 diferentes concentrações dos inibidores por 48 horas (entre 100 a 0,00001 µM para vemurafenib e 10 a 0,000001 µM para cobimetinib). Após o esse período, foi realizado ensaio de proliferação celular utilizando cristal violeta (CV) (BONNEKOH, et al., 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011), onde após fixação das células com solução de 50% etanol (Vetec, cat. V000107-1L), 49% H₂O ultrapura (UP, 18,3 MΩ) e 1% ácido acético glacial (Biotec, cat. 42383), foi adicionado o corante CV (Sigma, Cat. C0775) a 0,25 mg/mL e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Após, as placas foram lavadas duas vezes com água destilada e o CV presente no interior das células foi eluído com solução de ácido acético glacial (Biotec, cat. 42383) 33% (v/v) em água

destilada e lido em espectrofotômetro de microplacas (Biotek Epoch) em comprimento de onda de 570nm, presente no Laboratório de Biologia Adaptativa da UFPR. Foram realizados 4 experimentos independentes para cada célula, em quadruplicatas técnica, e as médias obtidas das quadruplicatas foram utilizadas para calcular os valores de IC₅₀ através do *software GraphPad Prism*.

4.4 Formação de esferoides

Foram utilizadas três diferentes abordagens para obtenção dos esferoides (sensibilização de placa, matriz de baixa adesão e *Hanging drop*) (Figura 6). Nessas abordagens foram utilizadas 20 diferentes densidades celulares iniciais para a formação de esferoides em monocultura (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 e 6000 células por esferoides). Para a cocultura com a célula THP-1 (monócito humano) foi adicionado 50 ng/mL de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma, cat. 79346) para promoção da diferenciação dos monócitos em macrófagos (MAEß et al., 2014; ROBINSON et al., 2017). Foram testadas 3 (1000, 3000 e 6000 células totais, para CHL-1, MeWo e Sk-Mel 147) ou 5 diferentes densidades celulares (100, 500, 900, 3000 e 6000 células totais para Sk-Mel 28) em duas proporções: 1:10 e 3:10 (macrófago:melanoma). Todos os testes de formação de esferoides seguiram até o décimo dia de cultura (para uma avaliação a longo prazo em cultura da estabilidade e manutenção da estrutura), quando os esferoides foram fotografados e medidos usando o programa Fiji ImageJ onde foi medido o diâmetro ou área dos esferoides obtidos em todas as técnicas, levando-se em consideração a região central da estrutura. Esses dados então foram tabulados no programa *GraphPad Prism*. Os protocolos para obtenção dos esferoides utilizando todas as técnicas, aqui brevemente descritas, estão descritos detalhadamente nos anexos I a IX.

4.4.1 SENSIBILIZAÇÃO DE PLACA

Em placas de 96 poços com fundo em U (Sarstedt, ref. 82.1582.005) foram adicionados 200 µL de solução de agarose ultrapura (USB, cat. 32802) a 0,5% previamente liquefeita por aquecimento. Em seguida a solução foi rapidamente

retirada, de forma que a agarose fosse mantida apenas formando um filme no poço. Após, a placa foi mantida em cabine de segurança biológica sob luz UV por 30 minutos para esterilização e a temperatura ambiente para solidificação da agarose. Diferentes densidades de células de melanoma humano em monocultura ou em cocultura com as células do sistema imunitário, como descrito no item 4.4 foram plaqueadas sobre a agarose, de forma que cada poço formasse um único esferoide de cada condição, e mantidas sob condições de cultivo para a formação dos esferoides (Figura 6.A).

4.4.2 MATRIZ DE BAIXA ADESÃO

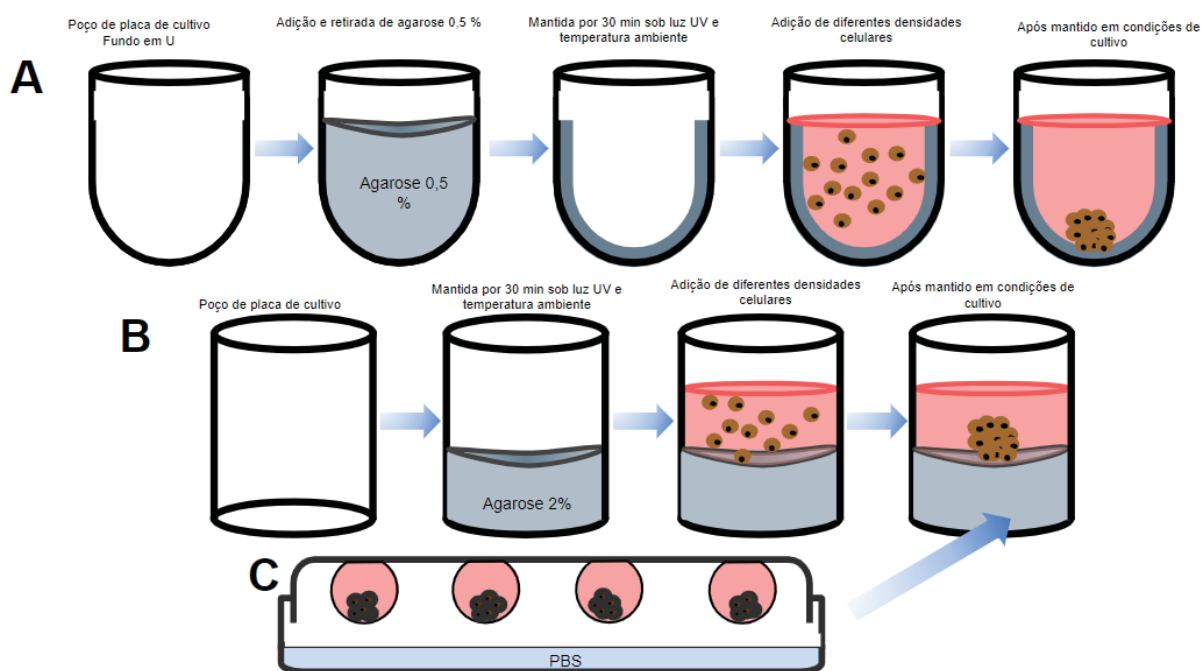
Foram adicionados, utilizando retropipetagem, 70 μ L de agarose a 2% previamente liquefeita por aquecimento, em uma placa de 96 poços (Sarstedt, ref. 83.3924). A placa foi mantida em cabine de segurança biológica sob luz UV por 30 minutos, para esterilização e a temperatura ambiente para solidificação da agarose. Após, foram adicionadas sobre a agarose as quantidades apropriadas de células como descrito no item 4.4, de forma que em cada poço um único esferoide fosse formado, seja monocultura ou cocultura (Figura 6.B). Após adicionar as células, a placa foi mantida sob condições de cultivo (incubação umidificada a 37 °C e 5% de CO₂) para formação dos esferoides.

4.4.3 HANGING DROP

Para esta técnica as diferentes densidades de células, como descrito no item 4.4, em monocultura ou cocultura foram semeadas em gotas suspensas de 10, 15, 20, 25 e 30 μ L. Cada gota, afastada pelo menos 1 cm da outra, foi adicionada no interior da tampa de uma placa de Petri esteril (Greiner Bio-one, ref. 630164). Para manter a umidade no ambiente criado, foi adicionado tampão fosfato-salino (PBS) no interior da parte de baixo da placa de Petri.

Após a formação dos esferoides, dois dias após o plaqueamento, esses foram transferidos para uma placa com matriz de baixa adesão (item 4.4.1), com o auxílio de uma pipeta Pasteur de 5 mL, e então mantidos sob condições de cultivo por mais 8 dias (Figura 6.C).

Figura 6 - Métodos utilizados neste estudo para produção de esferoides



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Técnicas utilizadas neste trabalho para produção de esferoides em mono e cocultura. Em (A) técnica da sensibilização de placa com agarose a 0,5%; (B) matriz de baixa adesão com agarose a 2% e; (C) *hanging drop*, com transferência para uma placa de matriz de baixa adesão.

4.5 ESFEROIDES EXPOSTOS AOS INIBIDORES

Os esferoides em monocultura de cada linhagem de melanoma ou em cocultura com as células THP-1 foram produzidos utilizando as técnicas previamente descritas. Após a obtenção das estruturas 3D (dois dias após adicionar as células), essas foram expostas a 3 concentrações dos inibidores (vemurafenib e cobimetinib), levando em consideração os valores de IC_{50} encontrados para cada célula (valor de IC_{50} , maior que o IC_{50} da célula com mutação em BRAF (0,44 μM para o vemurafenib e 1,6 μM para o cobimetinib) e maior que todos os IC_{50} encontrados (60 μM para vemurafenib e 1,5 μM para cobimetinib) de 7 dias. Após, foram obtidas imagens no microscópio com câmera acoplada Leica DMIL dos esferoides no microscópio com câmera acoplada e seus tamanhos foram quantificados utilizando o programa Fiji ImageJ, onde foi mensurada a área de cada uma das estruturas. Foram quantificados pelo menos 3 esferoides de cada condição em 2 experimentos independentes. O

grupo controle foi exposto à concentração proporcional de DMSO (0,6 µL/ 200µL), que é o veículo dos inibidores.

4.6 Morte celular

Após a formação dos esferoides, esses foram expostos às concentrações de IC_{50} determinadas para cada célula, por 7 dias. Após período de exposição, os esferoides foram lavados com HBSS a 37 °C e incubados com 2 µM de calceína AM (Invitrogen, ref. C3100MP) por 1 hora sob condições de cultivo. Após o período foram adicionados 20 µL de Iodeto de Propídio (PI; BD biosciences, cat. 550825) e incubado por mais 1 hora sob condições de cultivo. Após, foram obtidas imagens de fluorescência utilizando microscopia de varredura a laser confocal Nikon A1R MP+ do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da UFPR.

5 RESULTADOS

Os resultados aqui demonstrados visaram determinar protocolos específicos para produção de esferoides das 4 linhagens celulares de melanoma humano utilizadas neste trabalho, em monocultura ou cocultura com monócitos diferenciados em macrófagos. Após tal determinação, foi avaliado o comportamento das estruturas tridimensionais quando expostas a fármacos que atuam, no geral, sobre células de melanoma com determinadas mutações.

5.1 DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS GERAIS E ESTRUTURAIS PARA PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DOS ESFEROIDES

Para avaliação das estruturas tridimensionais obtidas foram determinados alguns critérios de quais características dos esferoides seriam consideradas suficientes para adotarmos cada metodologia para cada linhagem celular testada. Os critérios foram:

- formação de estrutura não-bidimensional, com sobreposição de células;
- produção de uma única estrutura por poço/gota;
- estrutura com formato esférico (esferoide);
- estrutura tridimensional estável ao longo do tempo de cultura;
- poço/gota com o mínimo de células soltas da estrutura principal.

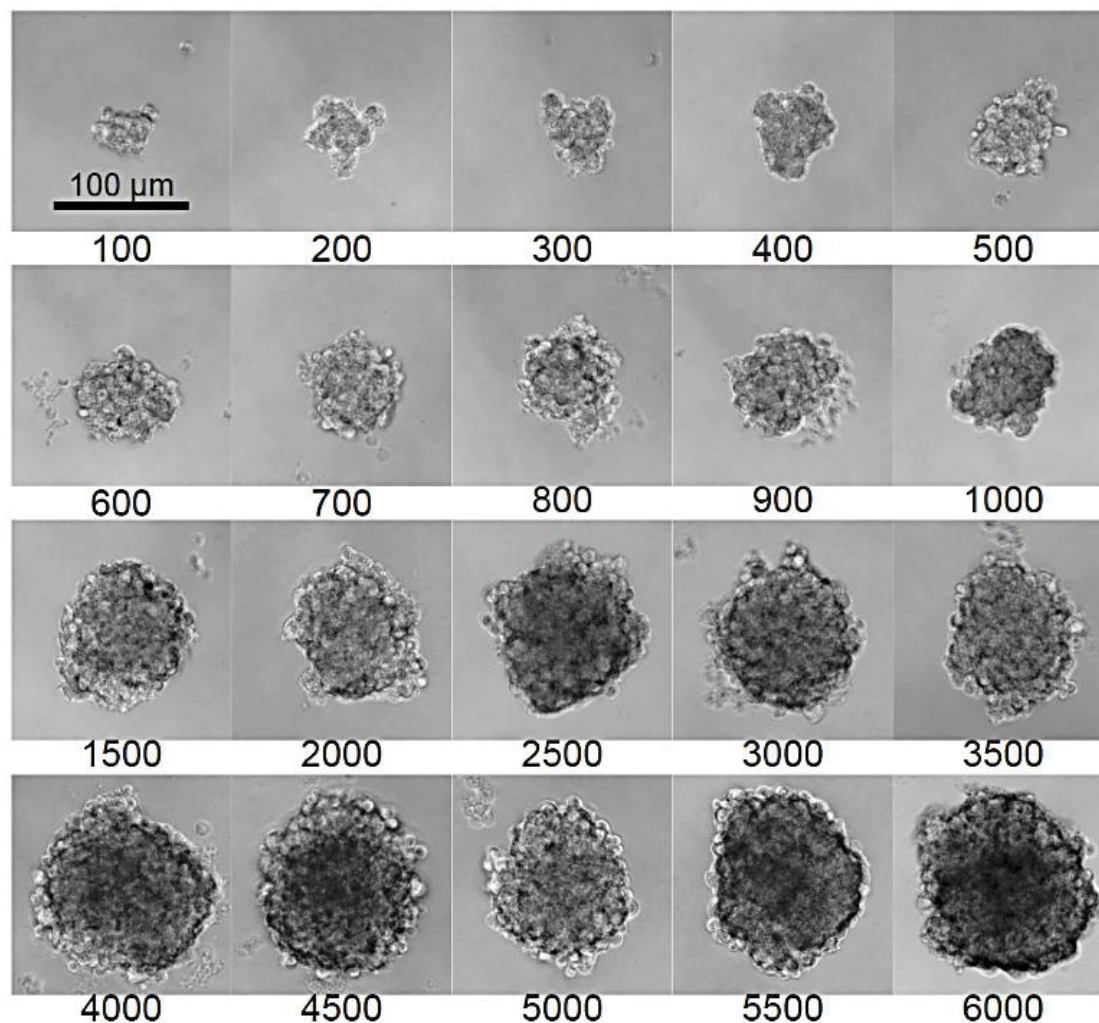
Tais características foram utilizadas para diminuir a variabilidade, tanto em número de células entre os esferoides de um mesmo grupo quanto diferentes superfícies de contato com o meio, por exemplo. As variações poderiam comprometer estudos comparativos, como o caso do teste com drogas-referência, objeto de estudo deste trabalho, uma vez que esferoides diferentes quando expostos a compostos podem resultar em falsas interpretações.

5.1.1 MEWO (*NF-1*)

Para as células MeWo, modelo representativo de células de melanoma humano com mutação no gene *NF-1*, foram testadas as técnicas de matriz de baixa

adesão e *hanging drop* para formação de estrutura 3D em monocultura. Para o método de *hanging drop* foram testados três volumes de gota: 10, 15 e 20 μL , mas não foi observada formação de esferoides, em nenhuma das 20 densidades testadas. Já para o método de plaqueamento em matriz de baixa adesão todas as densidades testadas formaram esferoides. Foi possível observar esferoides com diâmetros iniciando em aproximadamente 42 até 94 μm , a depender do número de células iniciais (Figura 7).

Figura 7 - Esferoides em monocultura da célula MeWo

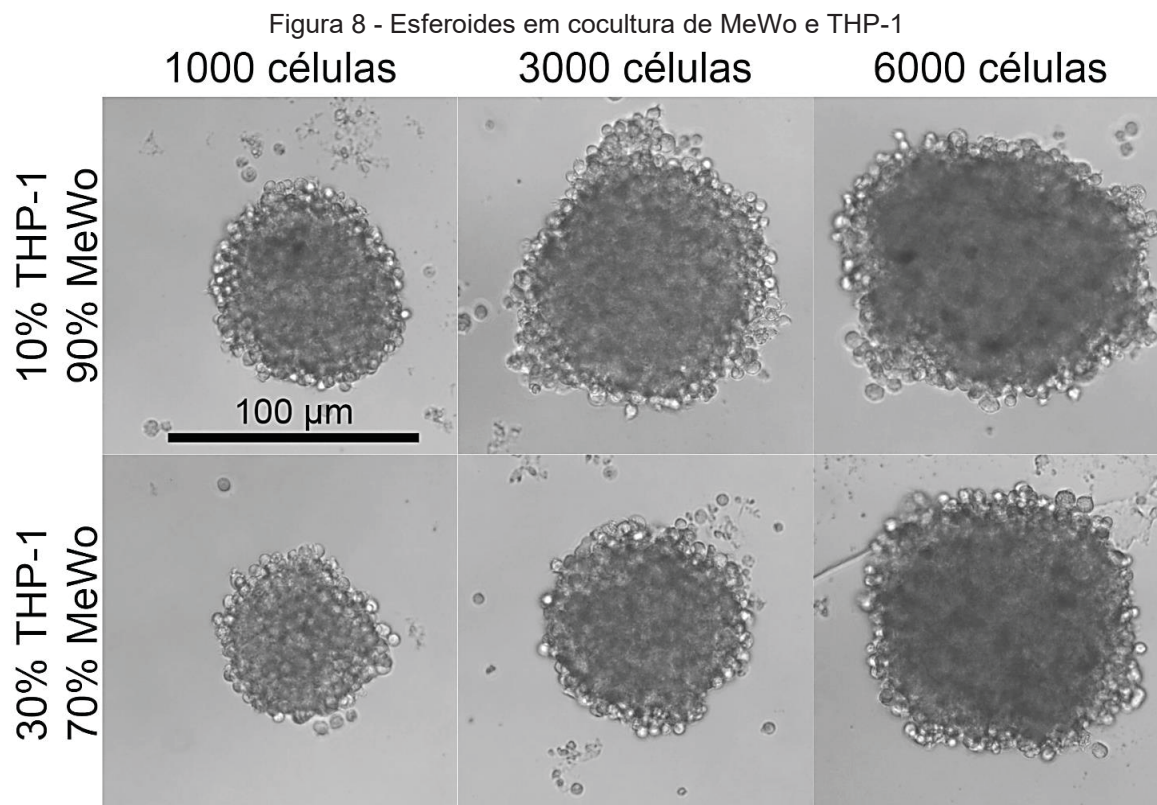


Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides da célula MeWo semeados sob a técnica de matriz de baixa adesão. Estão demonstrados esferoides representativos das 3 replicatas técnicas e 20 diferentes densidades celulares utilizadas (de 100 a 6000 células por poço). Imagens obtidas após 10 dias em cultura.

Assim como observado para a monocultura, os experimentos de cocultura com a célula MeWo e THP-1 demonstraram que apenas uma das técnicas foi capaz de produzir esferoides. Contudo, para a cocultura foram obtidos esferoides apenas na

técnica de *hanging drop*, diferente do observado na monocultura. Esferoides obtidos variaram de 53,7 a 98,31 μm de diâmetro (Figura 8), a depender do número de células iniciais. Esferoides em mono e cocultura, com o mesmo número total de células inicial apresentaram tamanhos e morfologias próximas, quando comparados (Tabela 2), com tamanhos variando entre 0,84 e 23,46%.



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Esferoides da célula de melanoma humano MeWo cocultivadas com a linhagem de monócito humano diferenciada para macrófago THP-1, obtidos através da técnica de *hanging drop* em 3 diferentes densidades (1000, 3000 e 6000 células por gota/poço) e duas proporções (10%/90% e 30%:70% de THP-1/MeWo).

Tabela 2 - Medidas dos esferoides de MeWo

	MeWo					
	Monocultura		Cocultura (THP-1)			
			10%		30%	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1000 células	70,16 μm	1,92	76 μm	1,26	53,7 μm	1,31
3000 células	72,9 μm	1,89	90,2 μm	2,91	72,29 μm	1,59
6000 células	93,37 μm	1,27	98,31 μm	0,84	84,79 μm	1,58

Fonte: O autor (2022)

Legenda: Média e desvio padrão dos diâmetros dos esferoides de obtidos de MeWo em monocultura ou cocultura com THP-1 nas 3 densidades testadas.

5.1.2 SK-MEL 147 (NRAS)

Para as células Sk-Mel 147, aqui utilizadas como modelo de células com mutação no gene *NRAS*, foram realizadas as técnicas de matriz de baixa adesão e *hanging drop*. Quando semeadas em monocultura utilizando a técnica de matriz de baixa adesão não foram observadas estruturas 3D após 10 dias em nenhuma densidade testada, onde as células se apresentaram individualizadas nos poços. Já para a técnica do *hanging drop*, após 2 dias foi observada a formação de estruturas quando as células foram semeadas em 15 µL por gota. Essas foram então transferidas para a placa com matriz de baixa adesão onde foram observados esferoides variando de 21 a 103,33 µm de diâmetro (Figura 9), de acordo com o número inicial de células plaqueadas.

Entretanto, para os esferoides plaqueados em cocultura com THP-1, foi avaliado que tanto a metodologia de *hanging drop* quanto a de matriz de baixa adesão formaram estruturas tridimensionais onde foram obtidos esferoides que variam de 39,67 a 80,64 µm de diâmetro (Figura 10), de acordo com o número inicial de células plaqueadas. Os esferoides em cocultura utilizando a técnica do *hanging drop* apresentaram morfologia parecida aqueles obtidos em monocultura na mesma técnica. Contudo os esferoides com 10% de THP-1 diferiram 32,64, 28,77 e 39,11% dos com a mesma densidade celular em monocultura. Já para os de 30% essa diferença foi de 35,29, 43,89 e 21,94% (Tabela 3).

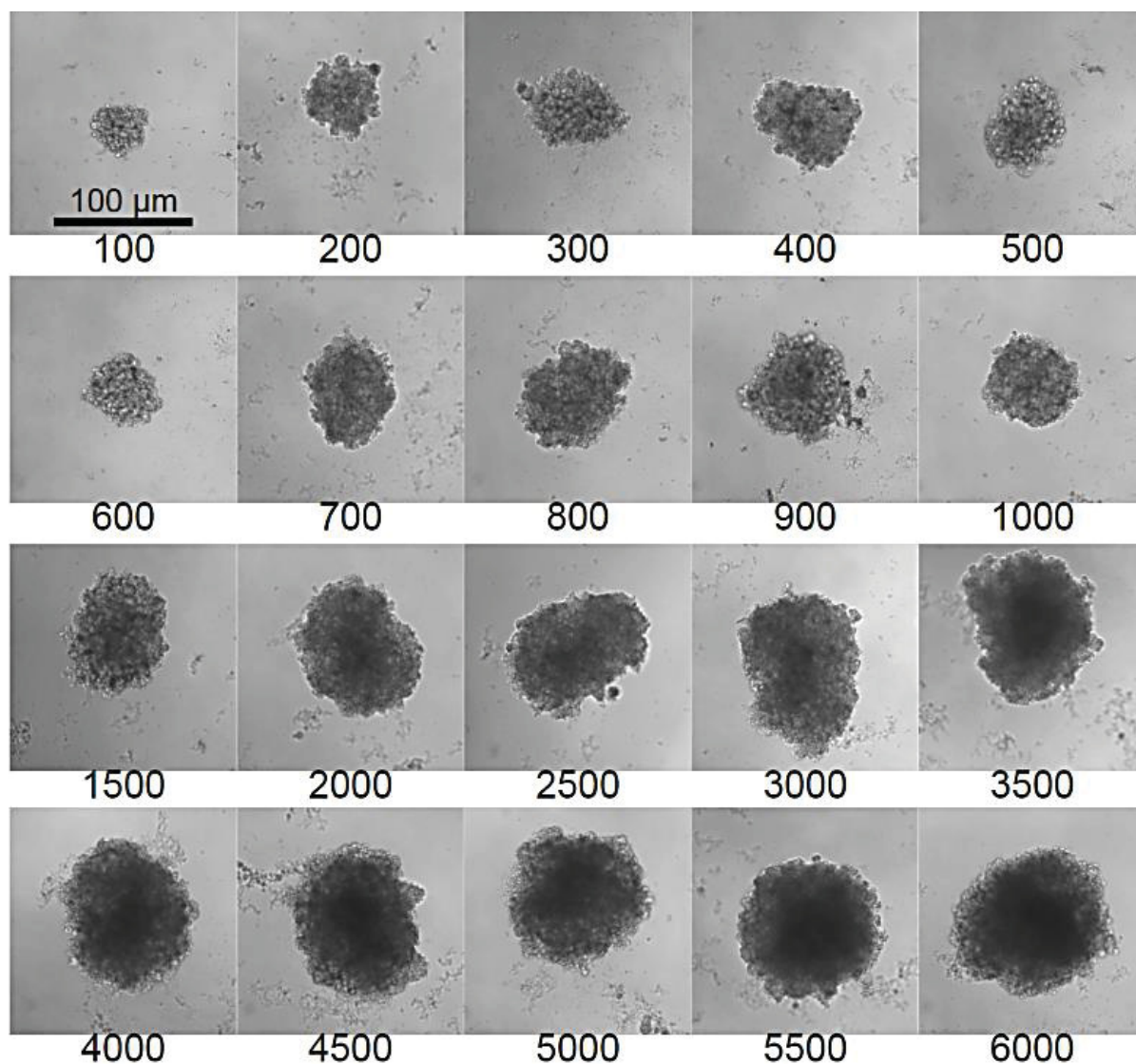
Tabela 3 - Medidas dos esferoides de Sk-Mel 147

	Sk-Mel 147					
	Monocultura		Cocultura (THP-1)			
			10%		30%	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1000 células	61,3 µm	1,27	39,67 µm	2,85	41,29 µm	3,03
3000 células	96 µm	2,54	53,87 µm	1,57	68,38 µm	1,02
6000 células	103,3 µm	1,18	80,64 µm	0,86	62,9 µm	0,71

Fonte: O autor (2022)

Legenda: Média e desvio padrão dos diâmetros dos esferoides de obtidos de Sk-Mel 147 em monocultura ou cocultura com THP-1 nas 3 densidades testadas.

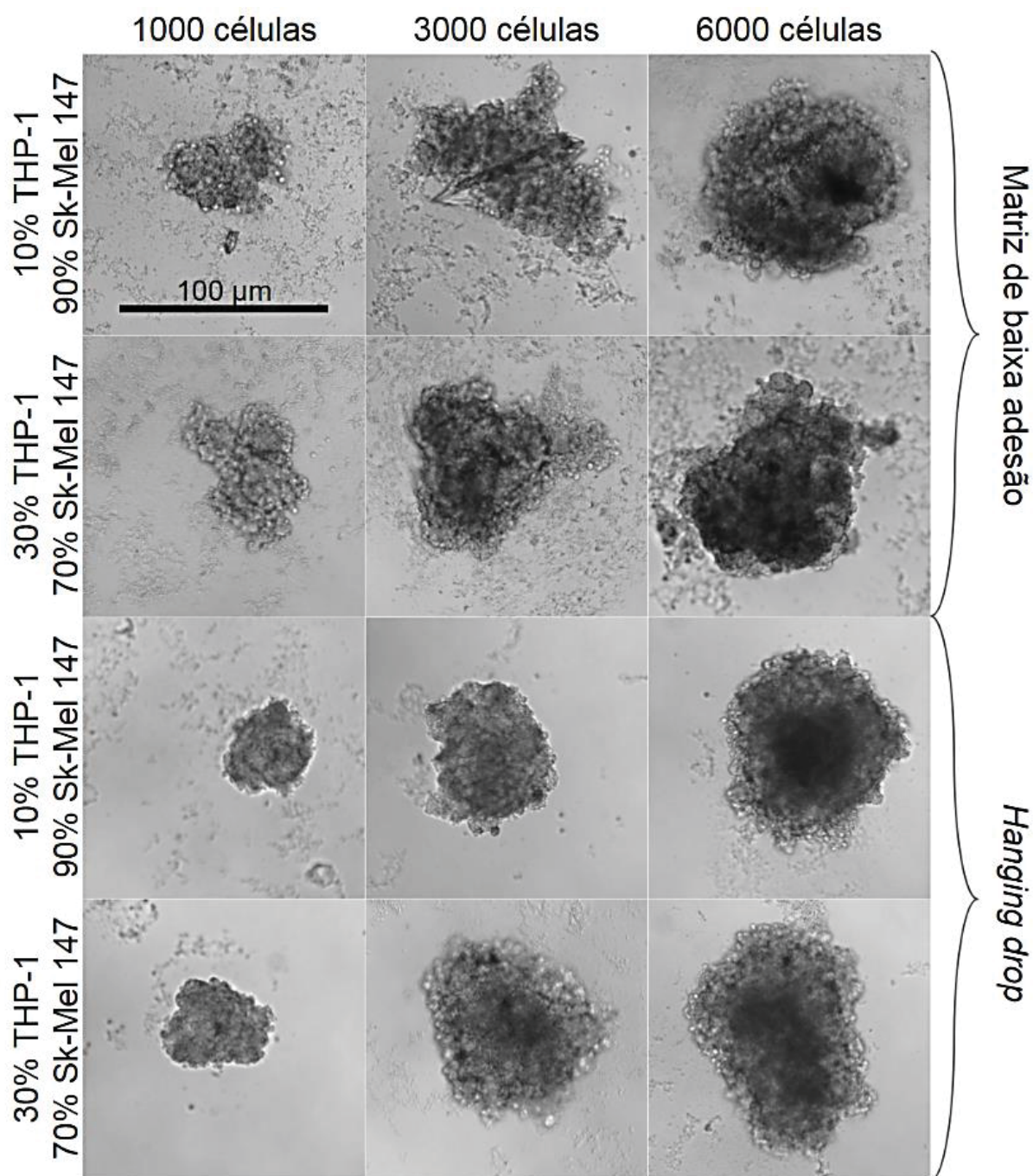
Figura 9 - Esferoides em monocultura da célula Sk-Mel 147



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides da célula Sk-Mel 147 semeados sob a técnica de *hanging drop* com transferência para placa de matriz de baixa adesão após 2 dias. Estão demonstrados esferoides representativos das 3 replicatas técnicas e 20 diferentes densidades celulares utilizadas (de 100 a 6000 células por poço). Imagens obtidas após 10 dias em cultura.

Figura 10 - Esferoides em cocultura de Sk-Mel 147 e THP-1



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides da célula de melanoma humano Sk-Mel 147 cocultivadas com a linhagem de monócito humano THP-1 diferenciada para macrófago, obtidos através das técnicas de matriz de baixa adesão e *hanging drop* em 3 diferentes densidades e duas proporções. Imagens obtidas após 10 dias em cultivo.

5.1.3 SK-MEL 28 (*BRAF*)

Para as células Sk-Mel 28, com mutação no gene *BRAF*, foram realizadas inicialmente as técnicas de matriz de baixa adesão e *hanging drop* para a formação de esferoide em monocultura. Para a técnica de matriz de baixa adesão foram testadas diversas modificações nos protocolos, como diferentes volumes de agarose (50, 90 e 100 μ L por poço), contudo não foi observada formação de estruturas tridimensionais que atendessem os critérios previamente estabelecidos. O mesmo resultado foi observado para a técnica do *hanging drop*, que também sofreu diversas adaptações quanto ao tamanho da gota (de 10 a 30 μ L) e tempo de transferência para placa de matriz de baixa adesão (de 1 a 4 dias) e ainda assim não foram observados esferoides formados, apenas agregados celulares sem estrutura esférica.

Dessa forma, foi então realizado o método de sensibilização de placa, onde foi observada formação de estruturas 3D em todas as densidades celulares, salvo a de 1000 células por poço. Foi possível observar esferoides que variaram de 25 a 223 μ m de diâmetro (Figura 11), dependente da concentração inicial plaqueada. Esse mesmo padrão foi observado para os ensaios utilizando cocultura com THP-1, onde tanto para matriz de baixa adesão quanto *hanging drop* não foram observadas estruturas tridimensionais com as células Sk-Mel 28. Apenas ao se utilizar a técnica de sensibilização de placa foi possível produzir esferoides, em todas as densidades e proporções testadas. Foram obtidos esferoides que variam de 49,57 a 128,63 μ m de diâmetro (Figura 12), de acordo com a densidade celular inicialmente plaqueada. Comparativamente, os esferoides em mono e cocultura possuem morfologia parecida, mas tamanhos diferentes. Na maioria dos casos os esferoides em cocultura apresentaram-se maiores que os em monocultura (Tabela 4). Enquanto os com 10% de THP-1 foram 43,14, 29,41 e 37,06% superiores em área, os com 30% foram 12,14, 40,92 e 51,62% superiores em área quando comparados aos de monocultura.

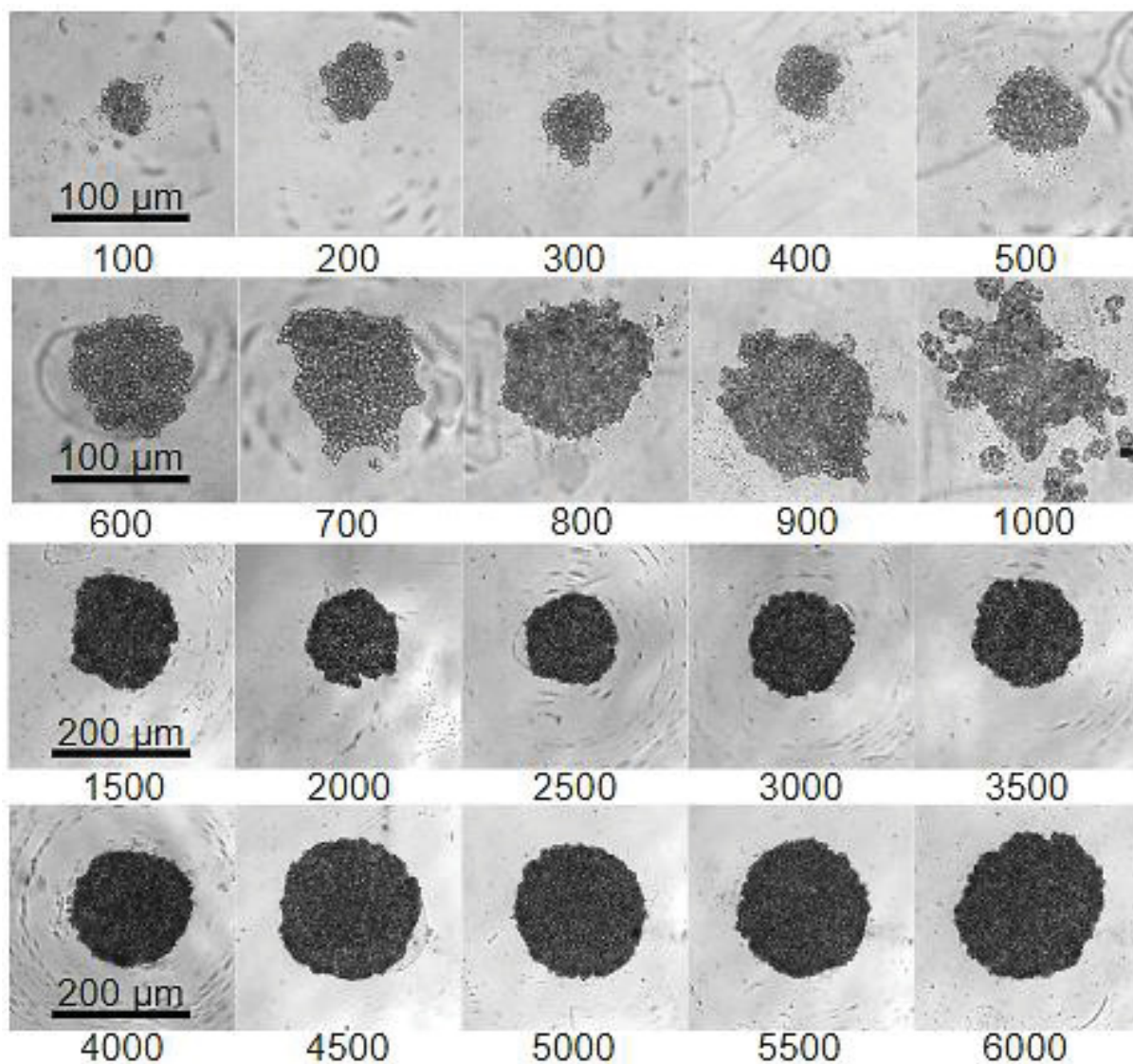
Tabela 4 - Medidas dos esferoides de Sk-Mel 28

	Sk-Mel 28					
	Monocultura		Cocultura (THP-1)			
			10%		30%	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
200 células	56,42 μm	1,34	49,57 μm	1,75	80,76 μm	1,91
500 células	74,3 μm	3,34	104,7 μm	1,54	96,15 μm	1,16
900 células	93,85 μm	2,42	142,3 μm	1,45	128,63 μm	1,45

Fonte: O autor (2022)

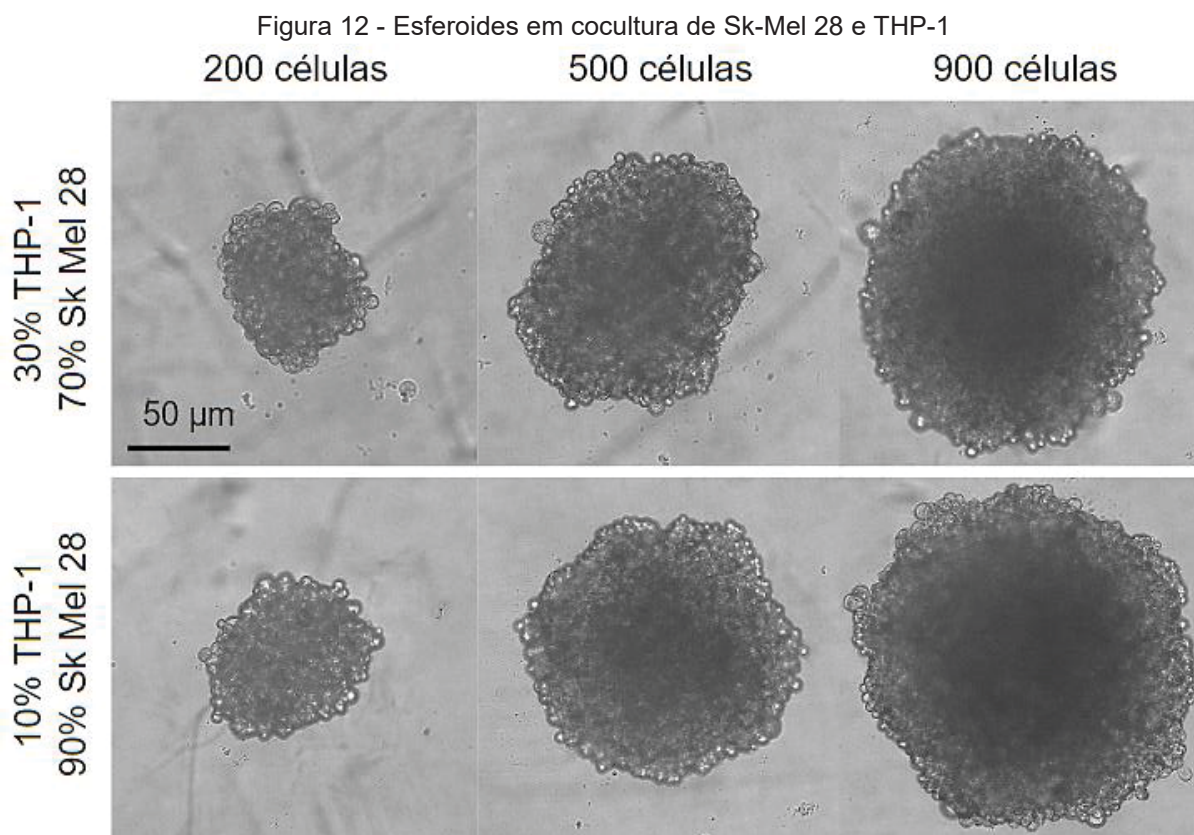
Legenda: Média e desvio padrão dos diâmetros dos esferoides de obtidos de Sk-Mel 28 em monocultura ou cocultura com THP-1 nas 3 densidades testadas.

Figura 11 - Esferoides em monocultura da célula Sk-Mel 28



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides da célula Sk-Mel 28 obtidos sob a técnica de Sensibilização de placa. Estão demonstrados os esferoides representativos das 3 replicatas técnicas e 20 diferentes densidades celulares utilizadas (de 100 a 6000 células por poço). Imagens obtidas após 10 dias em cultura. Barra de escala referente a cada linha de figuras.



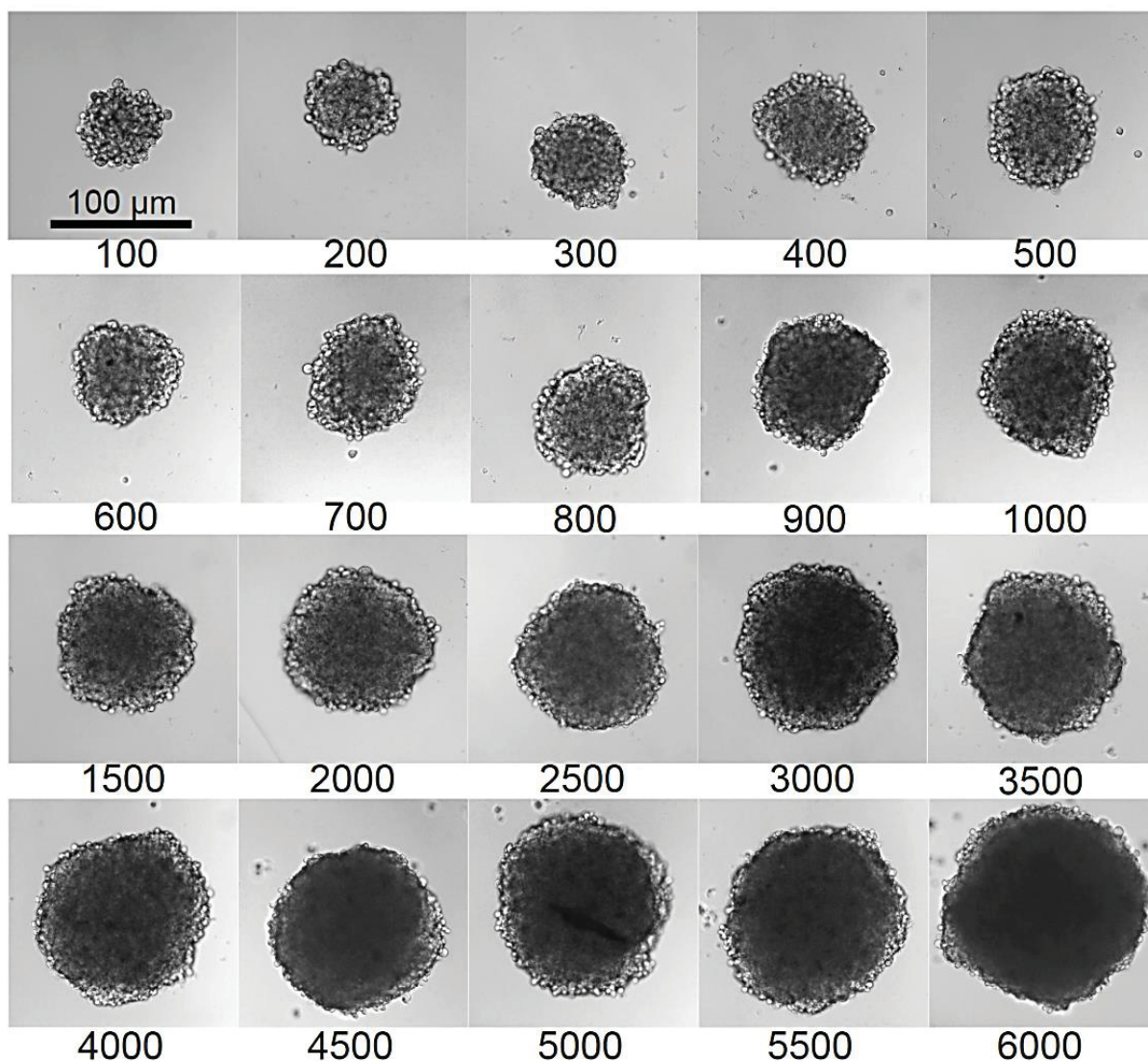
Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides da célula de melanoma humano Sk-Mel 28 cocultivadas com a linhagem de monócito humano diferenciada para macrófago THP-1, obtidos através da técnica de sensibilização de placa em 3 diferentes densidades e duas proporções. Imagens obtidas após 10 dias em cultivo

5.1.4 CHL-1 (TRIPLO NEGATIVO)

Assim como para as demais linhagens, foram realizadas as técnicas de *hanging drop* e plaqueamento em matriz de baixa adesão para a formação de esferoides em monocultura a partir das células CHL-1. Essas células são uma linhagem de melanoma humano que não possuem nenhuma das três principais mutações da doença (*NRAS*, *NF-1* e *BRAF*) e por isso são consideradas triplo negativa. Para o *hanging drop*, não foram observadas estruturas tridimensionais utilizando gotas de 10 e 15 μL . Já para a técnica de matriz de baixa adesão foi observada formação de estruturas que se enquadraram nos parâmetros pré-estabelecidos, em todas densidades celulares testadas, com esferoides variando de 61 a 148 μm de diâmetro (Figura 13), dependente da concentração inicial plaqueada.

Figura 13 – Esferoides em monocultura da célula CHL-1

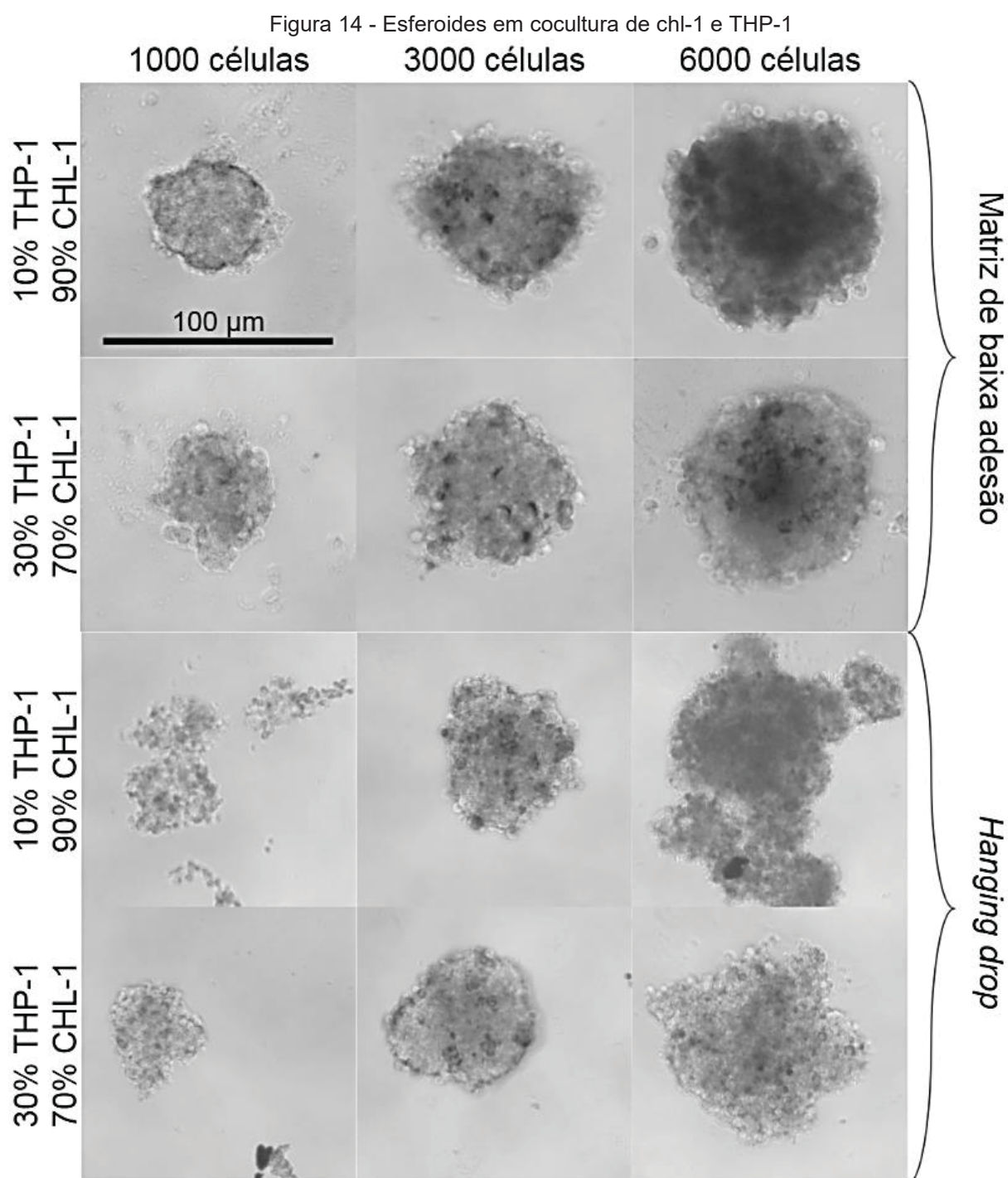


Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides da célula CHL-1 obtidos sob a técnica de matriz de baixa adesão. Estão demonstradas as 20 diferentes densidades celulares utilizadas (de 100 a 6000 células por poço).
Imagens obtidas após 10 dias em cultura.

Diferente do que foi observado na monocultura, na cocultura de CHL-1 com THP-1, tanto a metodologia de adicionar células em matriz de baixa adesão quanto o *hanging drop* (neste exceto nos esferoides de 1000 células) com gotas de 15 μL e transferência para placa de matriz de baixa adesão após 2 dias de plaqueamento formaram estruturas tridimensionais, com diâmetros variando entre 52 a 90 μm. Observou-se que todos os esferoides formados na placa com matriz de baixa adesão apresentaram formato esférico, diferente dos formados em *hanging drop* que, mesmo produzindo uma única estrutura, essa possuía formato lobular (Figura 14). É possível avaliar que os esferoides obtidos apresentaram tanto morfologia quanto tamanhos

diferentes, quando comparamos as mesmas densidades celulares em mono e cocultura (Tabela 5).



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides da célula de melanoma humano CHL-1 cocultivadas com a linhagem de monócito humano diferenciada para macrófago THP-1, obtidos através das técnicas de matriz de baixa adesão e *hanging drop* em 3 diferentes densidades e duas proporções. Imagens obtidas após 10 dias em cultivo.

Tabela 5 - Medidas dos esferoides de CHL-1

	CHL-1					
	Monocultura		Cocultura (THP-1)			
			10%		30%	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1000 células	95,58 μm	3,08	61 μm	2,32	52 μm	2,18
3000 células	98,89 μm	1,26	81,66 μm	1,27	78 μm	0,67
6000 células	148 μm	1,66	90 μm	2,88	85,66 μm	2,27

Fonte: O autor (2022)

Legenda: Média e desvio padrão dos diâmetros dos esferoides de obtidos de CHL-1 em monocultura ou cocultura com THP-1 nas 3 densidades testadas.

Comparando-se os esferoides em mono e cocultura, os produzidos com 10% de THP-1 foram 45,60, 21,12 e 42,12% menores que na monocultura. Essa diferença foi de 36,18, 17,42 e 39,19% para aqueles com 30% de THP-1.

Na tabela 6 estão sumarizadas as técnicas onde foram obtidos, em nosso estudo, esferoides com as células utilizadas. Nos casos como das coculturas de Sk-Mel 147 e CHL-1, em que mais de uma técnica produziu esferoides, foi escolhida a técnica que produziu esferoides condizentes com as premissas previamente estabelecidas no item 5.1.

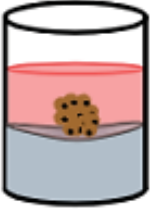
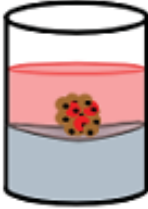
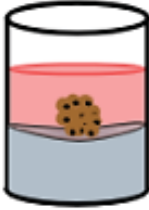
5.2 IC₅₀ em cultivo bidimensional

O valor de IC₅₀, valor estimado da ação inibitória que afeta 50% do volume celular e demonstra a diferença na ação de cada um dos inibidores, foi determinado para cada linhagem celular utilizada e para os dois inibidores (Tabela 7).

O cobimetinib é uma molécula utilizada como terapia alvo por ser inibidor seletivo da atividade catalítica das proteínas MEK1/2 na via de sinalização MAPk quinase. Os valores de IC₅₀ encontrados quando as células em monocultura 2D foram tratadas foram de 0,04395 μM para Sk-Mel 28 (*BRAF*), 0,9705 μM para MeWo (*NF-1*), 1,035 μM para CHL-1 (triplo negativa) e 1,193 μM para Sk-Mel 147 (*NRAS*,) (Gráfico 1 - A1, B1, C1 e D1 respectivamente).

Para a exposição ao vemurafenib, que também é uma molécula utilizada como terapia alvo por ser inibidor competitivo da proteína BRAF, os valores de IC₅₀ encontrados foram 0,1607 μM para Sk-Mel 28, 10,35 μM para MeWo, 13,22 μM para CHL-1 e 47,74 μM para Sk-Mel 147 (Gráfico 1 A2, B2, C2 e D2 respectivamente).

Tabela 6 - Sumário das técnicas utilizadas para obtenção de esferoides de cada célula

Célula	Mutação	Monocultura	Cocultura
CHL-1	Triplo negativa	 Matriz de baixa adesão	 Matriz de baixa adesão
Sk-Mel 147	NRAS	 <i>Hanging Drop</i>	 <i>Hanging Drop</i>
MeWo	NF-1	 Matriz de baixa adesão	 <i>Hanging Drop</i>
Sk-Mel 28	BRAF	 Sensibilização de placa	 Sensibilização de placa

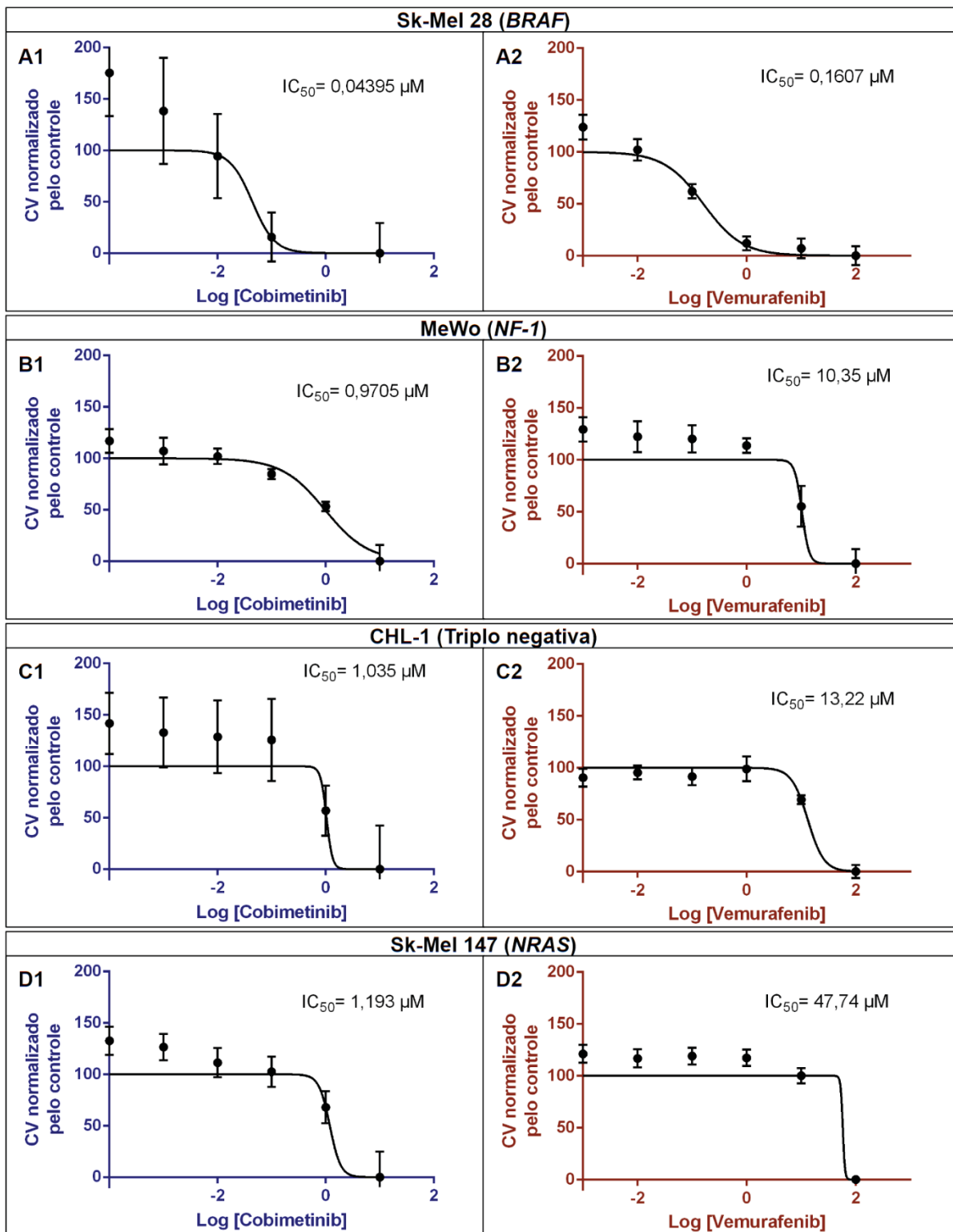
Fonte: O autor (2022).

Tabela 7 - Concentrações de IC₅₀ dos inibidores

Célula	Mutação	[] vemurafenib	[] cobimetinib
Sk-Mel 28	BRAF	0,1607 μ M	0,04395 μ M
MeWo	NF-1	10,35 μ M	0,9705 μ M
CHL-1	TN	13,22 μ M	1,0935 μ M
Sk-Mel 147	NRAS	47,74 μ M	1,193 μ M

Fonte: O autor (2022)

Legenda: Valores de IC₅₀ relativos a cada uma das células deste estudo e suas mutações. TN= triplo negativo.

Gráfico 1 - IC₅₀ das células tumorais

Fonte: O autor (2022)

Legenda: Gráficos em escala logarítmica das células humanas Sk-mel 28, MeWo, CHL-1 e Sk-Mel 147 expostas as terapias alvo. Em azul cobimetinib e vermelho vemurafenib. Estão plotados 6 dos 8 pontos da curva.

5.3 Avaliação do modelo 3D

Após a obtenção de esferoides a partir das técnicas padronizadas para cada linhagem individualmente, os esferoides foram expostos a 3 concentrações dos inibidores com o objetivo de avaliar o modelo. Sendo assim, foi utilizada a concentração de IC_{50} encontrada para cada linhagem celular (IC_{50} própria), uma dose superior à maior IC_{50} encontrada (60 μ M para vemurafenib e 1,5 μ M para cobimetinib) e uma dose maior que a IC_{50} da célula com mutação no gene *BRAF* (Sk-Mel 28) mas menor do que todas as outras (0,44 μ M para o vemurafenib e 1,6 μ M para o cobimetinib).

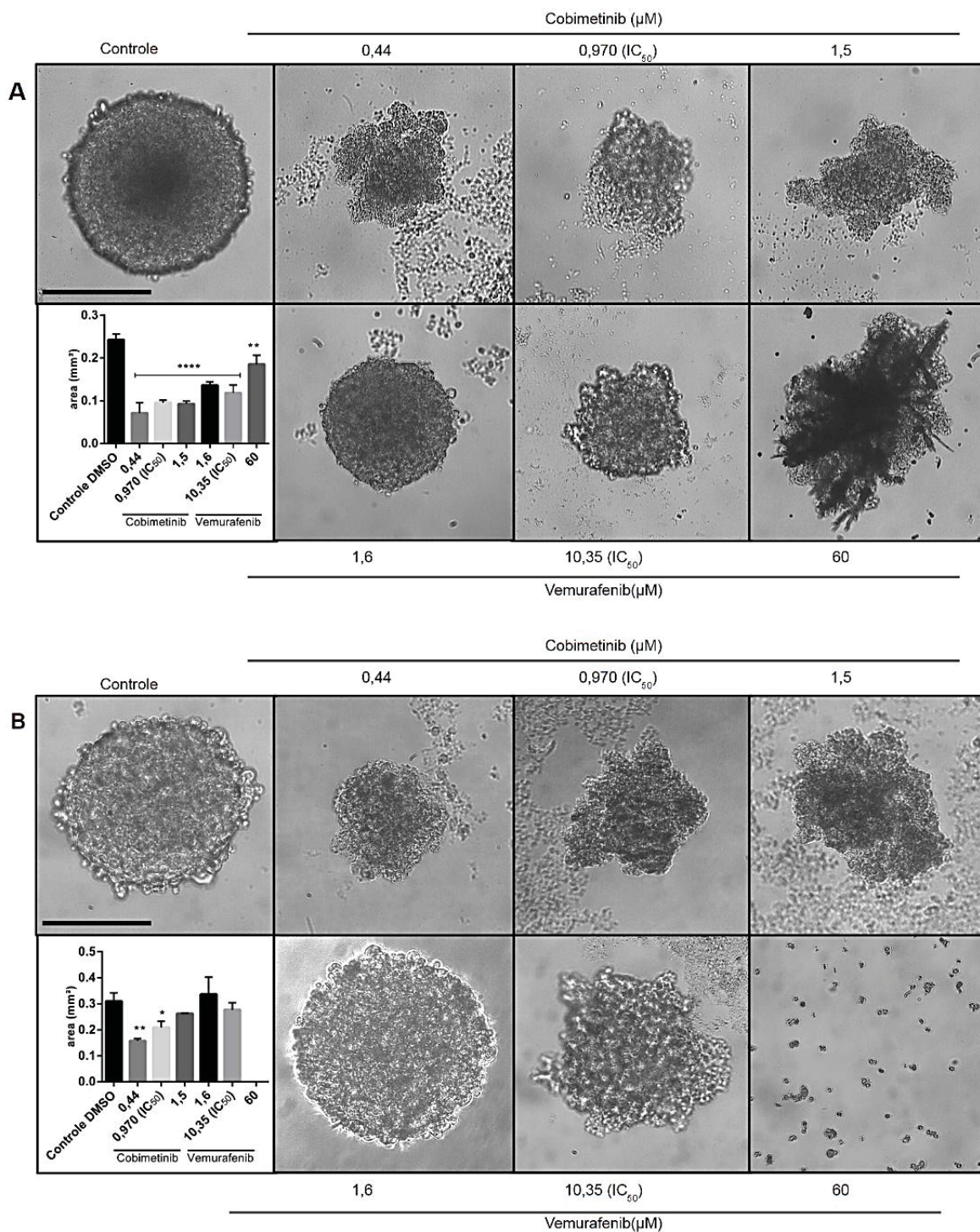
5.3.1 MEWO (NF-1)

Para as células MeWo, foi observado que, em monocultura comparando-se com o controle, houve diminuição estatisticamente significativa em todas as condições de exposição. Nas 3 concentrações do cobimetinib e a maior concentração do vemurafenib (60 μ M) causaram alterações morfológicas severas, com perda de células da estrutura do esferoide e ausência do formato esférico característico.

Já nas menores concentrações de vemurafenib (1,6 e 10,35 μ M) houve diminuição de área (de 43,83 e 51,23%, respectivamente) que aparenta ser concentração dependente, quando comparados ao controle. (Figura 15.A).

Nos esferoides de MeWo cocultivados com THP-1 expostos ao cobimetinib é possível avaliar que há uma desestruturação concentração dependente, onde o exposto a concentração de 0,97 μ M diminuiu 49,35% quando comparado ao controle. Já os expostos ao vemurafenib não apresentaram alterações estatisticamente significativa nas concentrações de 1,6 e 10,35 μ M. Porém, na maior concentração (60 μ M) houve a total desestruturação do esferoide, demonstrada pela ausência desse (Figura 15.B). Quando comparadas as marcações com calceína e PI, nas imagens obtidas em microscopia confocal (Figura 16) não foram observadas diferenças em nenhuma das marcações, tanto nos esferoides de monocultura quanto nos de cocultura.

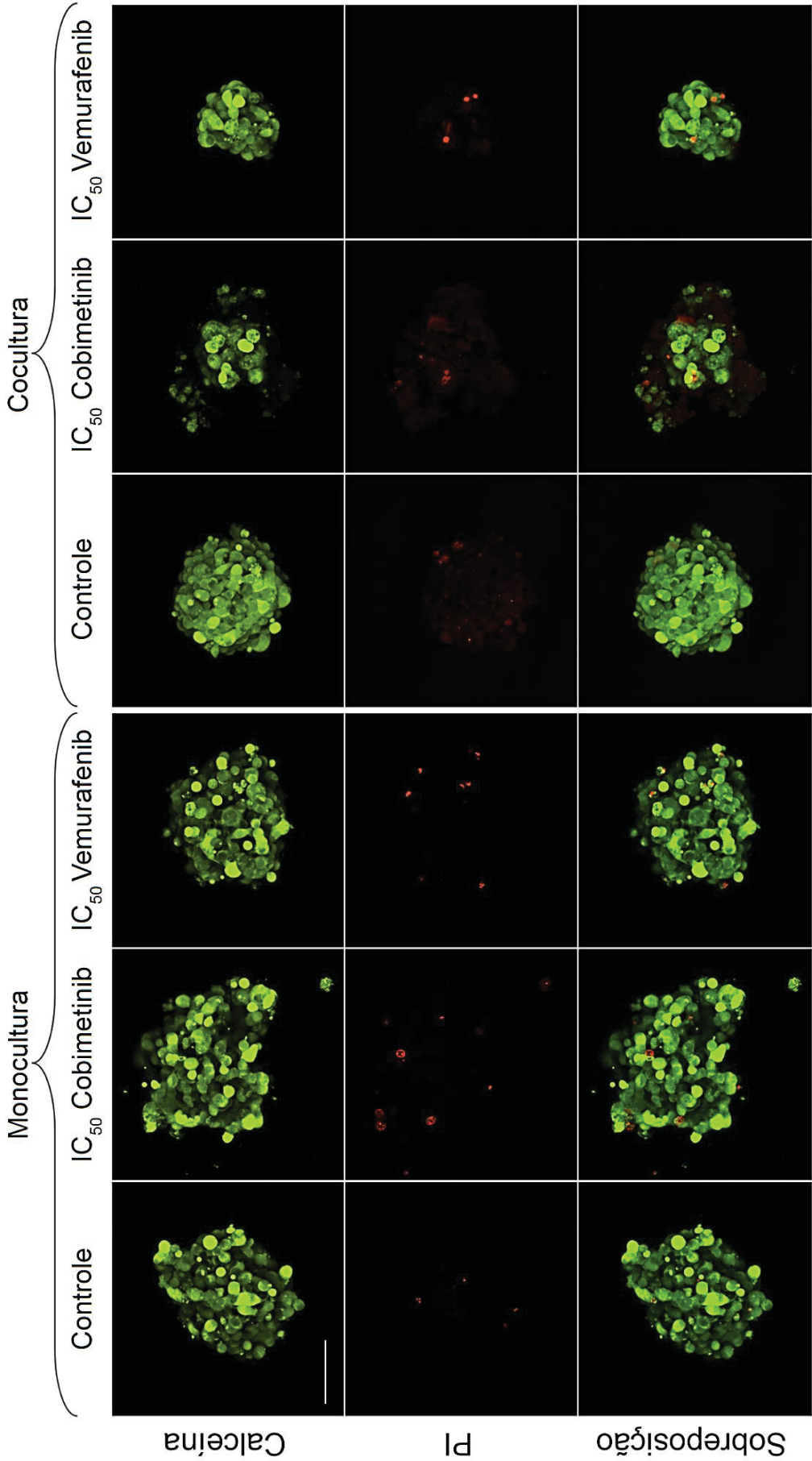
Figura 15 - Esferoides de MeWo expostos aos inibidores



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoide de MeWo em (A) monocultura e (B) cocultura expostos a 3 diferentes concentrações de Cobimetinib e Vemurafenib. Nos gráficos estão representadas média e desvio padrão de pelo menos 3 esferoides por grupo de dois experimentos independentes após 7 dias de exposição, onde foi realizado teste T não pareado. * = $P > 0.05 \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, **** = $P \leq 0.0001$. Barra de escala = 50 μm .

Figura 16 - Esferoides de MeWo em microscopia confocal



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Máxima projeção dos esferoides da célula MeWo (NF-1) marcados com calceína (verde) e PI (vermelho), indicando células viáveis ou não, respectivamente. Imagens obtidas após 7 dias de tratamento com IC₅₀ de cobimetinib e vemurafenib. Total de 10 dias em cultivo. Barra de escala: 100 µm

5.3.2 SK-MEL 147 (*NRAS*)

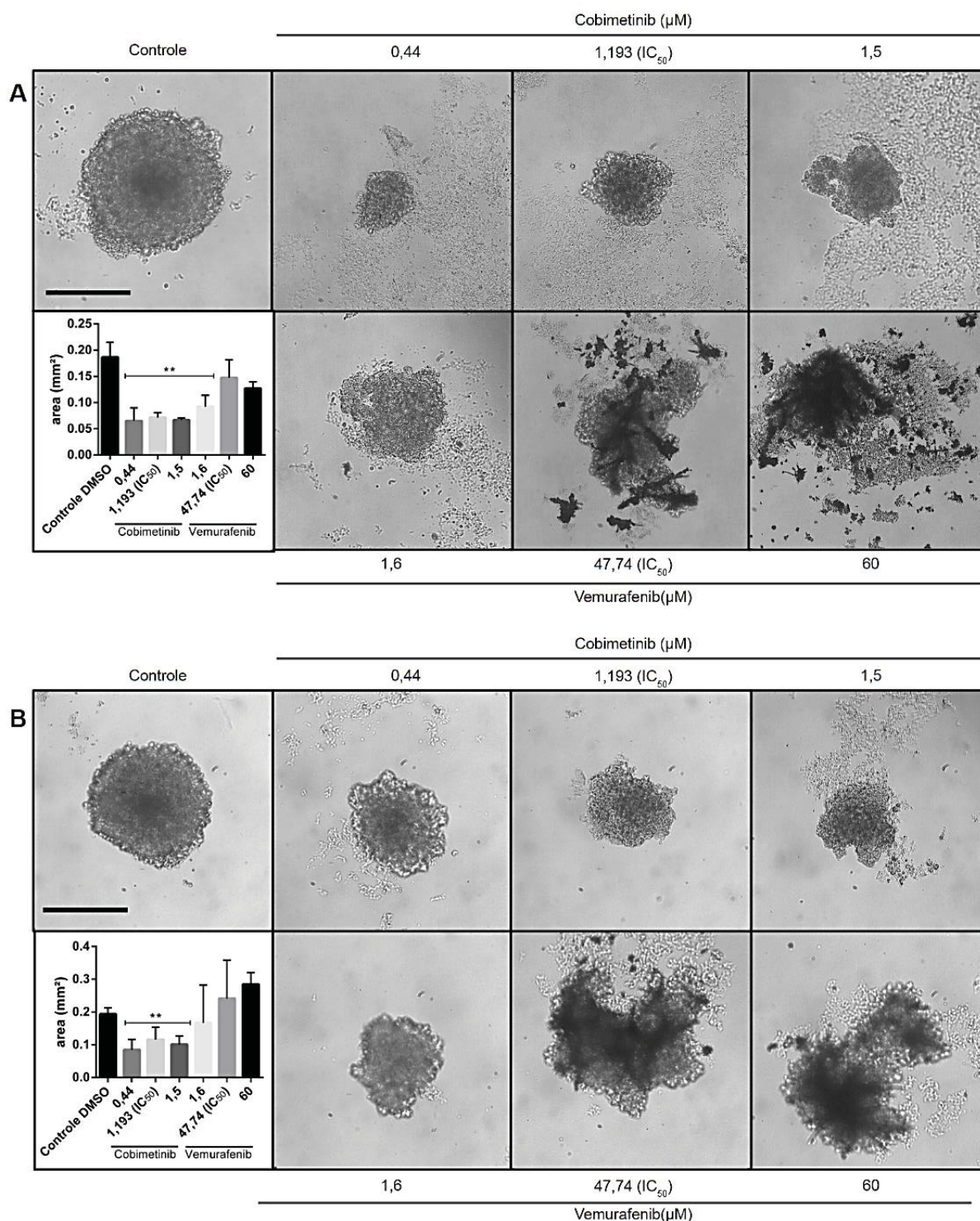
Os esferoides produzidos com as células Sk-Mel 147, que possuem mutação no gene *NRAS*, expostos ao cobimetinib não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, mas foram estatisticamente menores do que o controle nas concentrações de 0,44, 1,193 e 1,5 μM (sendo 65,16%, 61,95% e 64,63% menores que o controle na monocultura e 56,12%, 40,63% e 47,86% na cocultura, respectivamente). Além disso, principalmente na monocultura, foi possível observar diversas células soltas do esferoide (figura 17.A).

Para o vemurafenib (Figura 17.B) foi possível avaliar que na menor concentração (1,6 μM) o esferoide em monocultura foi 50,16% menor do que o controle - o que não ocorreu na cocultura - mas ambos mantiveram sua estrutura relativamente esférica. Diferentemente, os esferoides expostos às maiores concentrações do inibidor (47,74 e 60 μM), apresentaram severa desestruturação das suas características morfológicas, em comparação ao controle, com diversas células soltas e formação de estruturas em formato de cristais. Na marcação com calceína e PI não foram observadas alterações quando comparamos controle e tratados, tanto em monocultura quanto em cocultura (Figura 18).

5.3.3 SK-MEL 28 (*BRAF*)

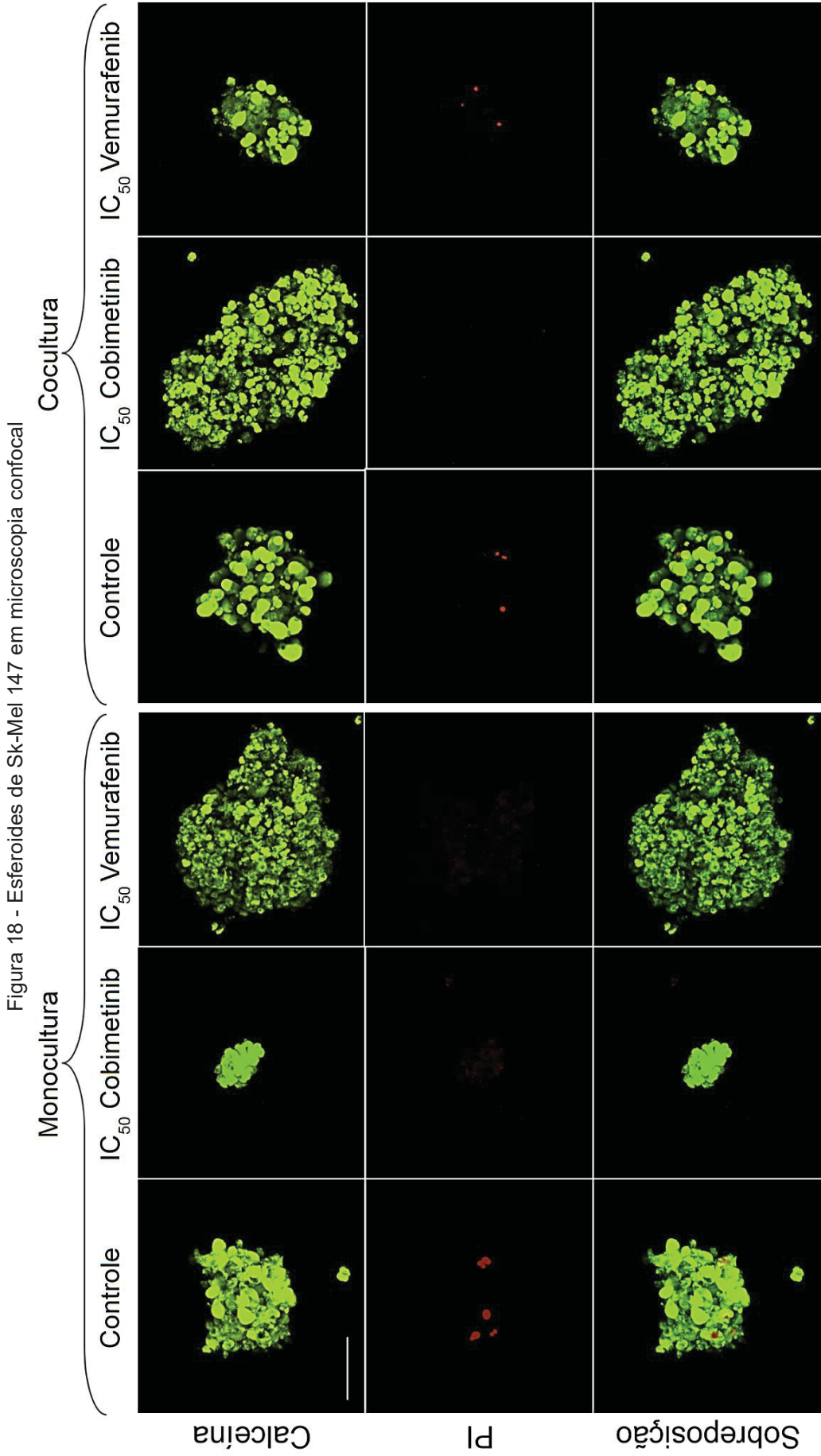
No caso dos esferoides de células Sk-Mel 28, tanto em monocultura quanto em cocultura expostos ao cobimetinib (0,043, 0,44 e 1,5 μM) e ao vemurafenib (0,16, 1,6 e 60 μM) apresentaram diminuição no tamanho quando comparados ao controle. Na monocultura do cobimetinib foi vista diminuição de 92,49%, 75,80%, 84,61% e de 55,50%, 90,59%, 71,90% para vemurafenib (valores respectivos a concentrações crescentes). Já na cocultura essa diminuição foi de 82,46%, 62,46% 66,92% para cobimetinib e de 45,54%, 80,92% e 77,54% para vemurafenib (valores respectivos a concentrações crescentes). Todos os esferoides expostos ao cobimetinib e os de cocultura expostos às duas maiores concentrações de vemurafenib (0,44 e 1,6 μM) apresentaram diversas células soltas, como é possível ver na figura 19. Assim como nas células anteriores, não foi observada alteração nas marcações com PI e Calceína em microscopia confocal (Figura 20).

Figura 17 - Esferoides de Sk-Mel 147 expostos aos inibidores



Fonte: O autor (2022)

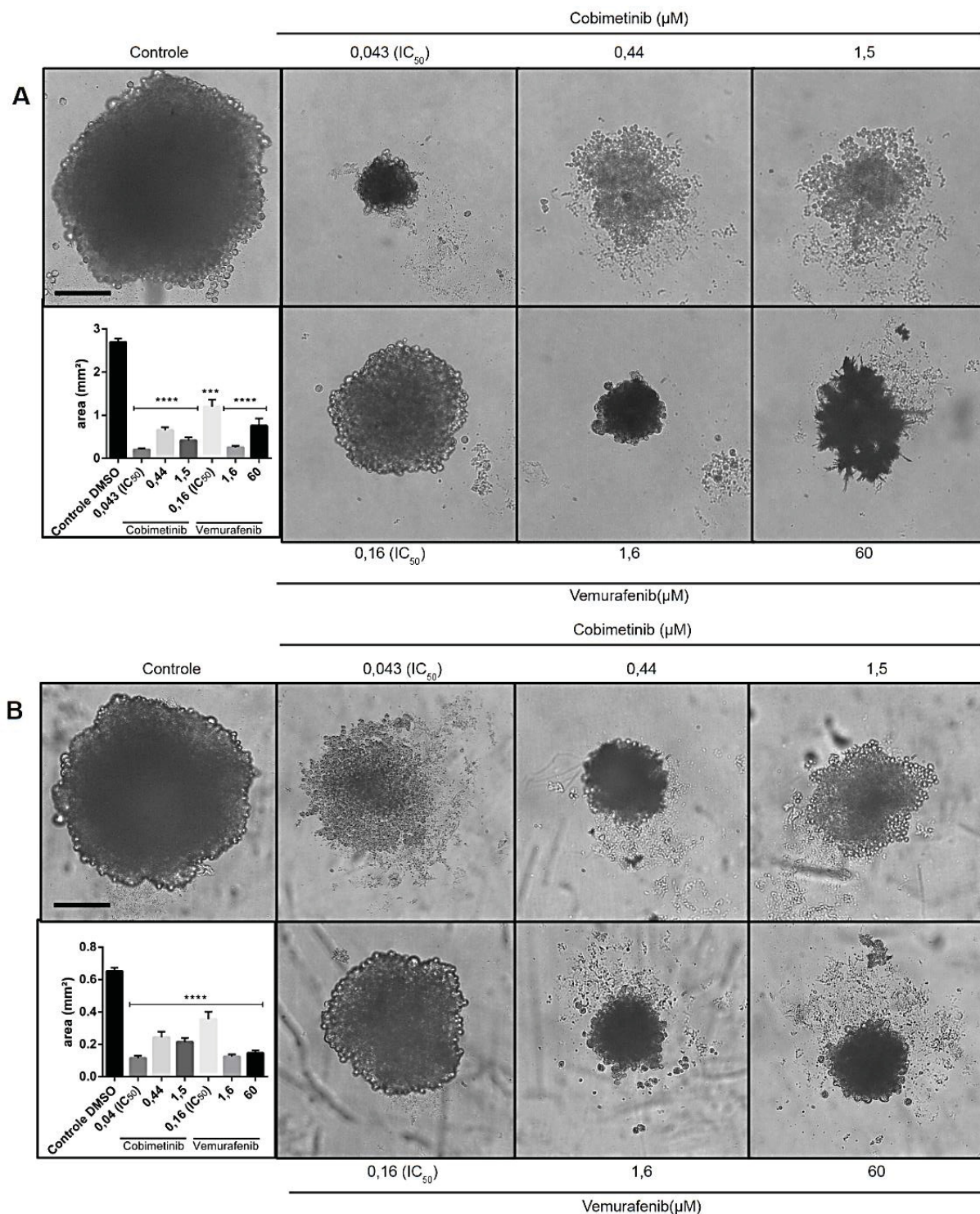
Legenda: Esferoide de Sk-Mel 147 em (A) monocultura e (B) cocultura expostos a 3 diferentes concentrações de cobimetinib e vemurafenib. Nos gráficos estão representadas média e desvio padrão de pelo menos 3 esferoides por grupo de dois experimentos independentes após 7 dias de exposição, onde foi realizado teste T não pareado ** = $P \leq 0.01$. Barra de escala = 50 μm .



Fonte: O autor (2022)

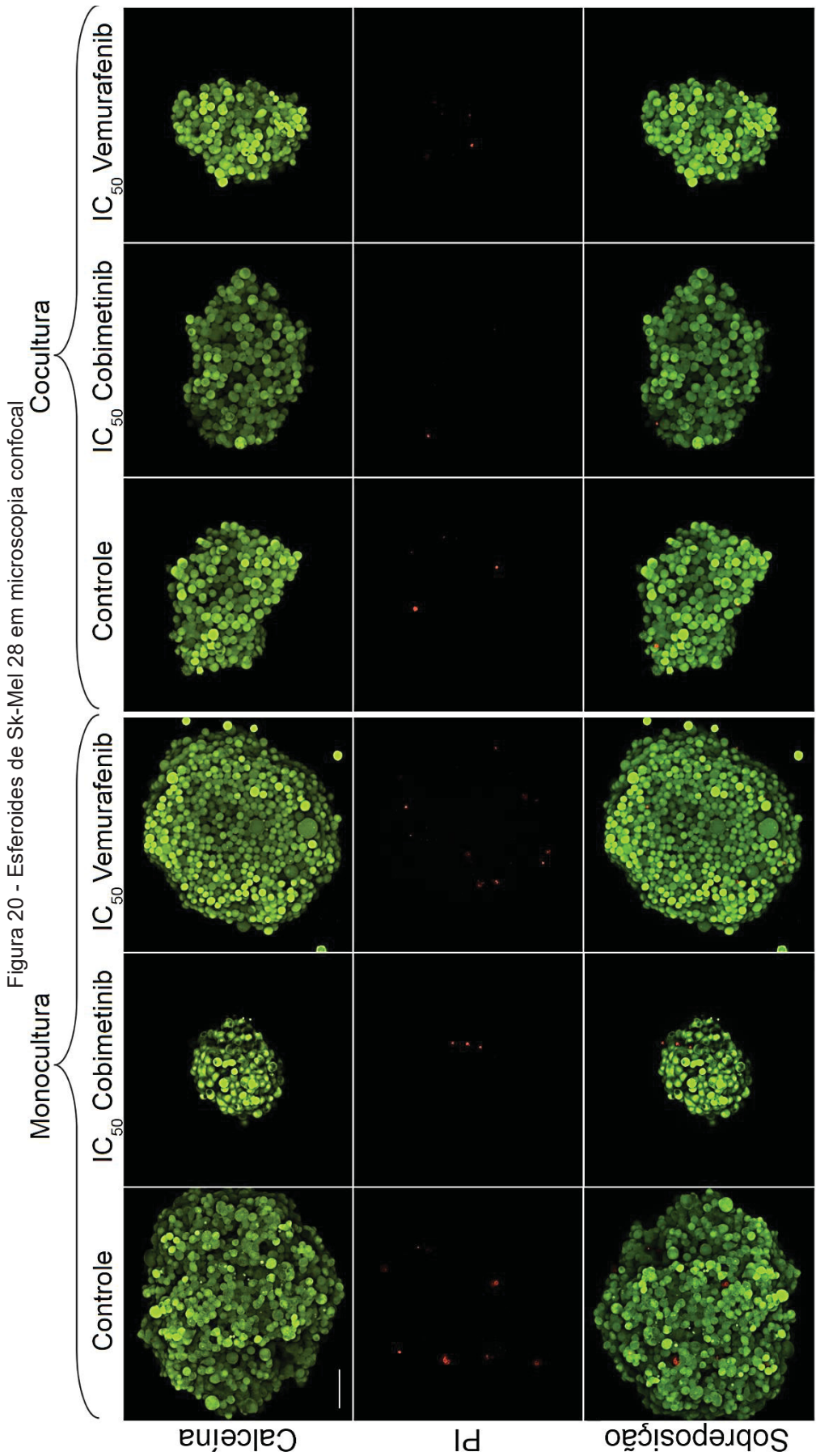
Legenda Máxima projeção dos esferoides da célula Sk-Mel 147 (NRAS) marcados com calceína (verde) e PI (vermelho), indicando células viáveis ou não, respectivamente. Imagens obtidas após 7 dias de tratamento com IC₅₀ de cobimetinib e vemurafenib. Total de 10 dias em cultivo. Barra de escala: 100 µM.

Figura 19 - Esferoides de Sk-Mel 28 expostos aos inibidores



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoide de Sk-Mel 28 em (A) monocultura e (B) cocultura expostos a 3 diferentes concentrações de Cobimetinib e Vemurafenib. Nos gráficos estão representadas média e desvio padrão de pelo menos 3 esferoides por grupo de dois experimentos independentes após 7 dias de exposição, onde foi realizado teste T não pareado. *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$. Barra de escala = 50 μm .



Fonte: O autor (2022)

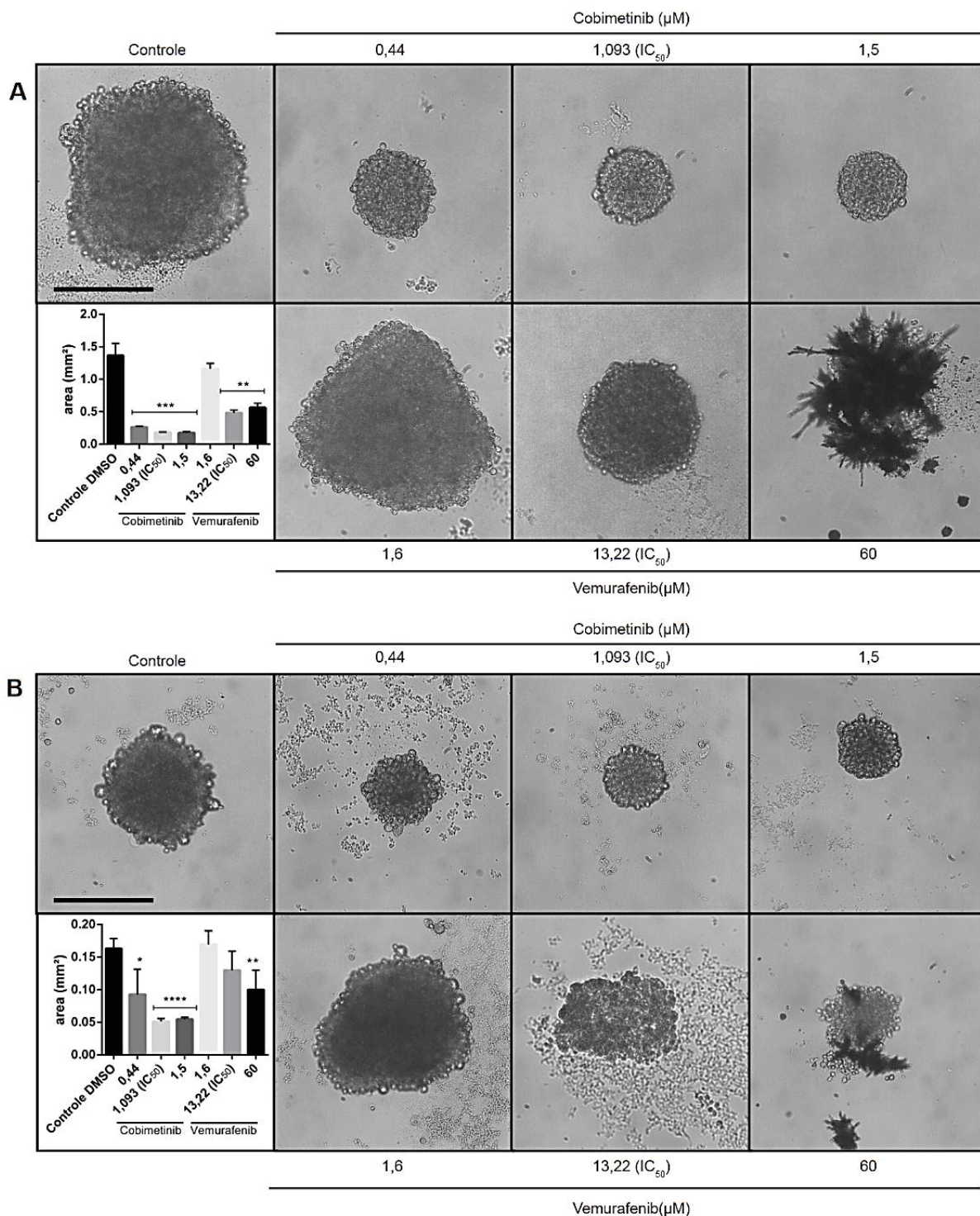
Legenda: Máxima projeção dos esferoides da célula Sk-Mel 28 (BRAF) marcados com calceína (verde) e PI (vermelho), indicando células viáveis ou não, respectivamente. Imagens obtidas após 7 dias de tratamento com IC₅₀ de cobimetinib e vemurafenib. Total de 10 dias em cultivo. Barra de escala: 100 µM

5.3.4 CHL-1 (TRIPLO NEGATIVA)

A avaliação dos esferoides produzidos em monocultura a partir da linhagem de células CHL-1, demonstrou que houve diminuição de 80,81%, 86,62% e 87,13% no tamanho dos esferoides expostos a 0,44, 1,093 e 1,5 μM do cobimetinib, respectivamente. O mesmo foi visto nas duas maiores concentrações de vemurafenib (13,22 e 60 μM , que diminuíram respectivamente 64,71% e 58,82%) onde a maior concentração desse levou a uma grande alteração morfológica na estrutura do esferoide, com formação de estrutura com aspecto de cristal (figura 21.A).

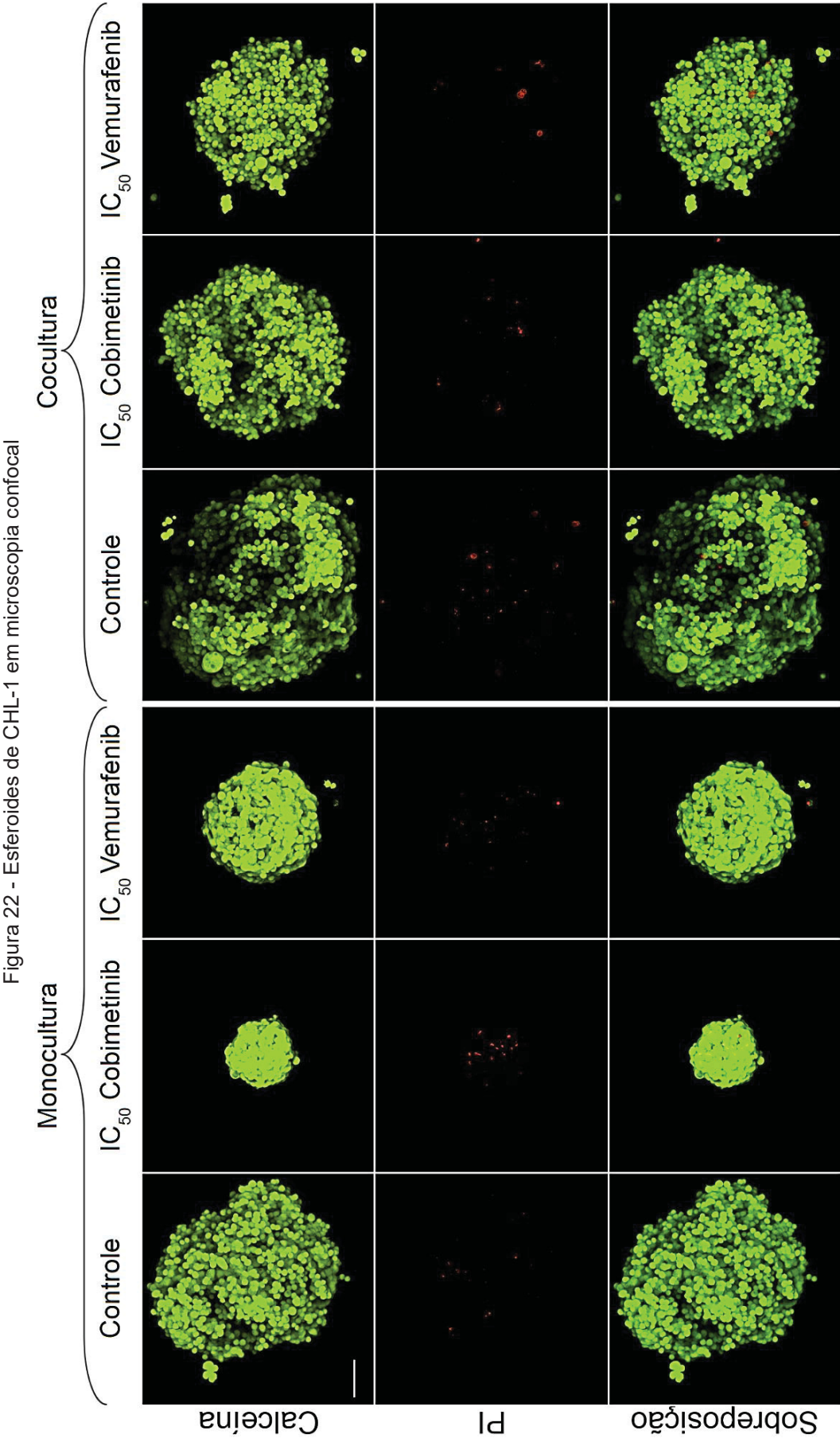
Quando em cocultura foi possível avaliar que a menor concentração de cobimetinib (0,44 μM) fez com que os esferoides perdessem células da sua estrutura (células soltas nos poços) e que o aumento na concentração do inibidor acentuou a diminuição de tamanho (de 43,56% no exposto a 0,44 μM para 68,71% e 66,87% nos expostos a 1,093 e 1,5 μM , respectivamente) quando comparado ao esferoide controle. Já para o vemurafenib, vemos uma ação dependente da concentração. As duas menores concentrações do inibidor (1,6 e 13,22 μM) não alteraram significativamente o tamanho do esferoide. Porém, na maior concentração, de 60 μM , a diminuição foi estatisticamente significativa, sendo cerca de 38,65% menor que o controle. Observou-se que há um gradativo declínio no tamanho, acompanhado por perda de células do esferoide e sua alteração morfológica (Figura 21.B). Seguindo o mesmo padrão observado para as outras células desse trabalho, não foram observadas diferenças nas marcações com PI e calceína ao se comparar esferoides expostos aos inibidores com os controles (Figura 22).

Figura 21 - Esferoides de CHL-1 expostos aos inibidores



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoide de CHL-1 em (A) monocultura e (B) cocultura expostos a 3 diferentes concentrações de Cobimetinib e Vemurafenib. Nos gráficos estão representadas média e desvio padrão de pelo menos 3 esferoides por grupo de dois experimentos independentes após 7 dias de exposição, onde foi realizado teste T não pareado. * = $P > 0.05 \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$. Barra de escala = 50 μm .



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Células CHL-1 (triplo negativa) marcadas com calceína (verde) e PI (vermelho), indicando células viáveis ou não, respectivamente. Imagens obtidas após 7 dias de tratamento com IC₅₀ de cobimetinib e vemurafenib. Total de 10 dias em cultivo. Barra de escala: 100 µM.

6. DISCUSSÃO

Cada vez mais, modelos tridimensionais se destacam em estudos *in vitro*. Suas características estruturais, assim como os gradientes de difusão distintos em determinadas regiões, que os aproximam as de um tecido, fazem com que sua utilização em testes pré-clínicos apresente resultados mais robustos. Esferoides, estruturas tridimensionais obtidas em cultivo *in vitro* representativas de modelos de tumores sólidos, são capazes de mimetizar características da porção avascular do tumor, por criar gradientes de pH, oxigênio e nutrientes que são importantes para o comportamento celular. A grande problemática na utilização de esferoides é manter sua uniformidade, seja estrutural ou metabólica, para que eles possam ser comparados entre si (HAM; KWON; KIM, 2021). E para além disso, é preciso que essa homogeneidade se mantenha, e que o esferoide possa se sustentar em cultura ao longo do tempo. Todas as características devem ser levadas em consideração quando pensamos em qual tecido queremos reproduzir *in vitro* (HIRSCHHAEUSER et al., 2010). A arquitetura original do tecido deve ser respeitada e por isso esferoides são um bom modelo se pensarmos em tumores sólidos. Uma vez que todas essas limitações forem superadas, as estruturas obtidas (robustas a ponto de serem reprodutíveis e representativas da arquitetura tecidual que se quer mimetizar) podem ser usadas como modelos para predição da ação de fármacos, seja na busca de novas drogas ou para identificar a melhor para um determinado paciente (XIE et al., 2022).

Como explicitado, o melanoma humano é subdividido em categorias que estão relacionadas com algumas mutações principais (em *BRAF*, *NRAS* e *NF-1*, além do grupo triplo negativo que não possui nenhuma dessas) e diferentes trabalhos trazem diferentes proporções de presença nos pacientes, mas sempre com *BRAF* como mais prevalente, seguida de *NRAS*, *NF-1* e triplo negativo (*The Cancer Genome Atlas Network*, 2015; SCATENA; MURTAS; TOMEI, 2021). Neste trabalho trouxemos inicialmente métodos para obtenção de estruturas tridimensionais, denominadas esferoides, de células humanas de melanoma. A escolha das células vai de encontro com a necessidade de se considerar as principais variáveis genéticas da doença.

Os dados genéticos relativos a cada linhagem, explicitados na sequência, foram obtidos do *My cancer Genome*, consórcio criado pela Associação Americana para a Pesquisa do Câncer (AACR) para se tornar um centro de distribuição de

informações genéticas de diversos tipos de cânceres (AACR Project GENIE Consortium, 2017; MICHEEL et al., 2018).

A linhagem de células Sk-Mel 28 é amplamente utilizada na literatura como um modelo de melanoma humano com mutação no gene *BRAF* (HIRATA et al., 2021; MILLER et al., 2022; DAI et al., 2022), sendo ainda modelo do tipo V600E (substituição de valina por ácido glutâmico no códon 600 do gene), a mutação do tipo *BRAF* mais prevalente em humanos (SMALLEY et al., 2008). A importância dessa proteína é tamanha que hoje pelo menos oito fármacos, aprovados pela FDA, a tem como alvo. Além disso, possuir essa mutação é critério de elegibilidade para pelo menos 106 ensaios clínicos no mundo (AACR Project GENIE Consortium, 2022).

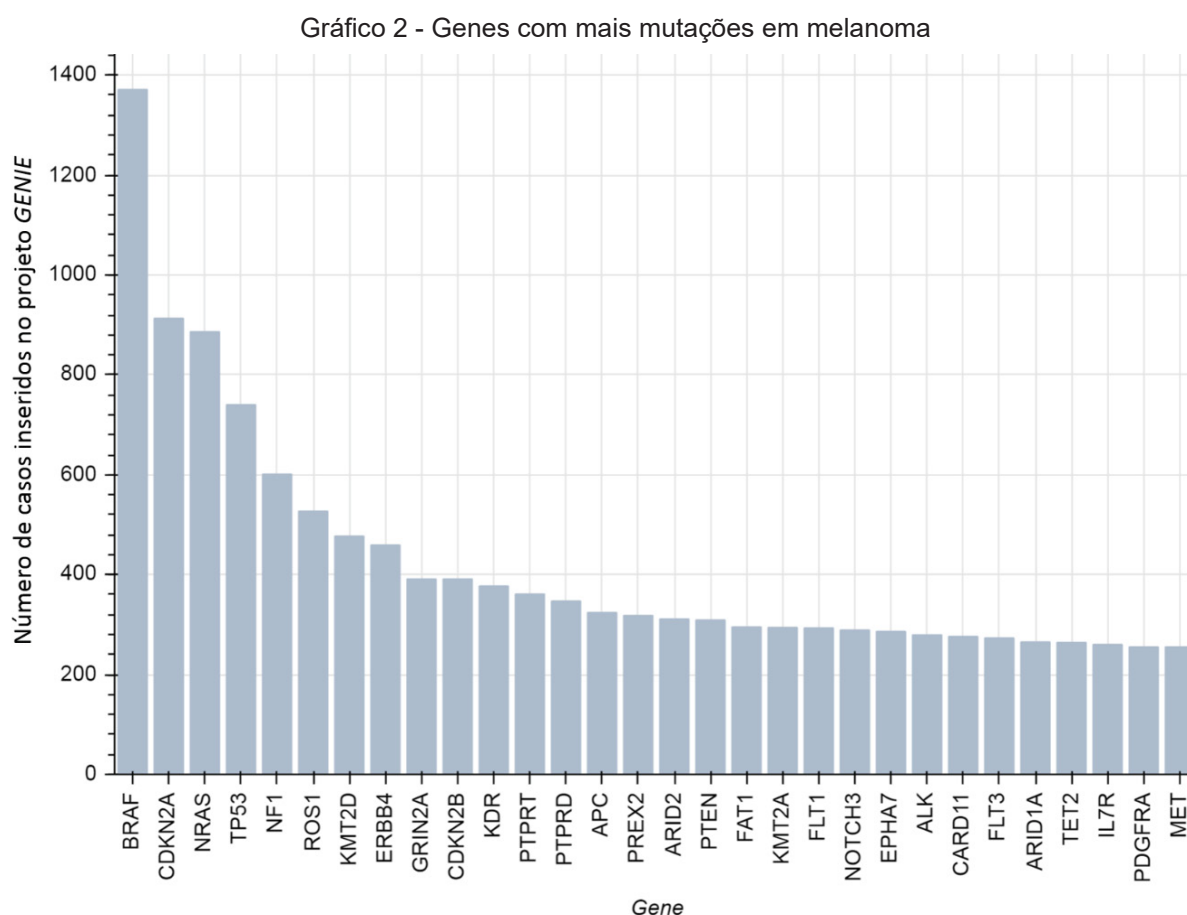
Sk-Mel 147 é uma linhagem de células que possui mutação no gene *NRAS* do tipo Q61R (substituição de glutamato por arginina no códon 61) (VOGEL et al., 2015; HIRATA et al., 2021). Hoje um inibidor seletivo de MEK, binimetinib, tem demonstrado menor recidiva em pacientes com mutação no gene *NRAS* (QUEIROLO; SPAGNOLO, 2017). Há ainda, 18 estudos clínicos no mundo que utilizam a mutação em *NRAS* como critério de inclusão (AACR Project GENIE Consortium, 2022).

Já a linhagem MeWo não é classicamente tida como um modelo para mutação em *NF-1*, mas artigos trazem que a proteína codificada por esse gene está ausente na linhagem (NISSAN et al., 2014) e que isso ocorre por uma mutação de perda de função, que faz com que a proteína gerada não seja capaz de atuar na via (TROUSIL et al., 2017; SHEIKH et al., 2017; ABECUNAS et al., 2022). Hoje, a proteína não é alvo de nenhuma droga aprovada pelo FDA, mas estar alterada é um dos critérios de inclusão em pelo menos 6 ensaios clínicos no mundo (AACR Project GENIE Consortium, 2022).

CHL-1, modelo celular que não possui mutação nesses três genes é, portanto, considerada triplo negativa. De forma interessante, essa célula possui mutações em outros genes importantes e de alta incidência na doença como *CDKN2A* e *TP53*, que juntamente a *BRAF*, *NRAS* e *NF-1* fazem parte das mutações com maior incidência em melanoma humano, demonstrando o alto grau de amplitude genômica deste estudo (Gráfico 2).

A linhagem de células THP-1 é derivada de monócito humano obtida de um paciente de 1 ano com leucemia monocítica aguda. Ela é tida como modelo para avaliação da modulação imune de monócitos humanos (CHANPUT; MES; WICHES,

2014; BOSSHART; HEINZELMANN, 2016). Muitos trabalhos a utilizam em cocultivo tridimensional, com células tumorais de pâncreas (JANG et al., 2021), cólon (DEVI et al., 2015), pulmão (REBELO et al., 2018), bexiga (MIYAKE et al., 2016), ovário (LI et al., 2022), glioblastoma (IBARRA et al., 2019; GATTAS et al., 2021), fibroblastos (KRUEGER et al., 2005) e ainda realizam o cocultivo bidimensional da célula Sk-Mel 28 com THP-1, onde foi demonstrado o aumento da motilidade da célula do sistema imune (SAGWAL et al., 2018). Foi encontrado também trabalho que realizou o cocultivo tridimensional entre THP-1 e uma linhagem de melanoma humano (linhagem MV3), que demonstrou diferentes morfologias no esferoide de acordo com a polarização dos monócitos (KAINULAINEN et al., 2022). Até o momento, não encontramos modelos de cocultura tridimensional utilizando macrófagos com nenhuma das linhagens de melanoma utilizadas nesse estudo.



Fonte: AACR Project GENIE Consortium (2019), disponível em
<https://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/>.

Legenda: Gráfico com o número de casos de melanoma humano na base de dados GENIE relativos a cada um dos principais genes em que ocorrem mutações.

Foi possível obter esferoides dos oito modelos proposto neste trabalho. É importante de antemão salientar que para todas as linhagens, tanto em monocultura quanto cocultura pelo menos uma das técnicas produziu esferoides com alta circularidade, fator determinante para que se reduza a variabilidade causada pela diferente distribuição de metabólitos na estrutura tridimensional: a circularidade faz com que essa distribuição seja a mesma em toda estrutura (ZANONI et al., 2016). Para CHL-1 há descrição da formação de esferoides utilizando técnicas também com matrigel (ELIADES et al., 2016; SHAUGHNESSY et al., 2019; GUHAN et al., 2021), assim como para MeWo, que também é descrita produzindo esferoides sobre agarose, como aqui descrito (CAPPARELLI et al., 2022). Para Sk-Mel 147 apenas um trabalho, também utilizando placa comercial, foi encontrado (PUDELKO et al., 2022). A grande vantagem do nosso modelo frente aos outros, é a facilidade de se obter esferoides com materiais típicos de laboratório de cultivo celular, sem a necessidade de obtenção de outros materiais. Outra vantagem é que, diferente das metodologias que se baseiam em matrigel, nossas metodologias formam um esferoide por poço/gota, indicando que a totalidade de células adicionadas formou a estrutura o que torna conhecido o número total de células de cada esferoide, favorecendo a comparação entre grupos, como feito em testes de *screening* de fármacos.

Considerando ainda as células utilizadas, modelo xenográfico que implantou as linhagens celulares CHL-1 e Sk-Mel 147 em camundongos do tipo BALB/c NUDE, demonstrou que os tumores formados pela Sk-Mel 147 possuem morfologia mais agressiva, com morfologia menos densa quando comparado ao tumor de CHL-1, que possui forma mais bem delimitada (MORORÓ, 2018). Essas características podem ser um ponto comparativo com os resultados vistos nos esferoides, onde os obtidos a partir da linhagem de células Sk-Mel 147 aparentam ser menos densos e com a borda mais irregular (Figura 9), quando comparados com os da célula CHL-1, que possuem borda regular, sem muitas células soltas (Figura 13). Essa característica menos agressiva também foi vista para a célula Sk-Mel 28 em modelo xenográfico, onde o tumor formado apresentou menor taxa de crescimento, quando comparado à outras células utilizadas no estudo (SHAFREN et al., 2004; AU et al., 2005). Ainda, modelo utilizando a célula MeWo (Figura 7) demonstrou poucos focos metastáticos após injeção subcutânea da célula (WICKLEIN et al., 2018).

É interessante criar modelos de melanoma cocultivados com macrófagos pois esse modelo tende a ter mais semelhança com o tecido tumoral de pacientes. Jensen e colaboradores (2009) observaram, a partir da amostra de 227 pacientes com melanoma em estágio I e II que a maior presença de macrófagos em amostras de biópsia do tecido tumoral estava associada com menor taxa de sobrevivência dos pacientes, estando então relacionados com um pior diagnóstico (PIENIAZEK; MATKOWSKI; PIOTR DONIZY, 2017; VOTANOPOULOS, et al., 2020). O estudo de macrófagos em ambiente tumoral foi avaliado ainda em modelo utilizando o camundongo humanizado da linhagem MISTRG, que demonstrou que, após transplantadas as células humanas no animal e induzido o tumor, as células do sistema imune se arranjavam de maneira altamente similar ao visto no tecido da biópsia de pacientes (VOILLET et al., 2022).

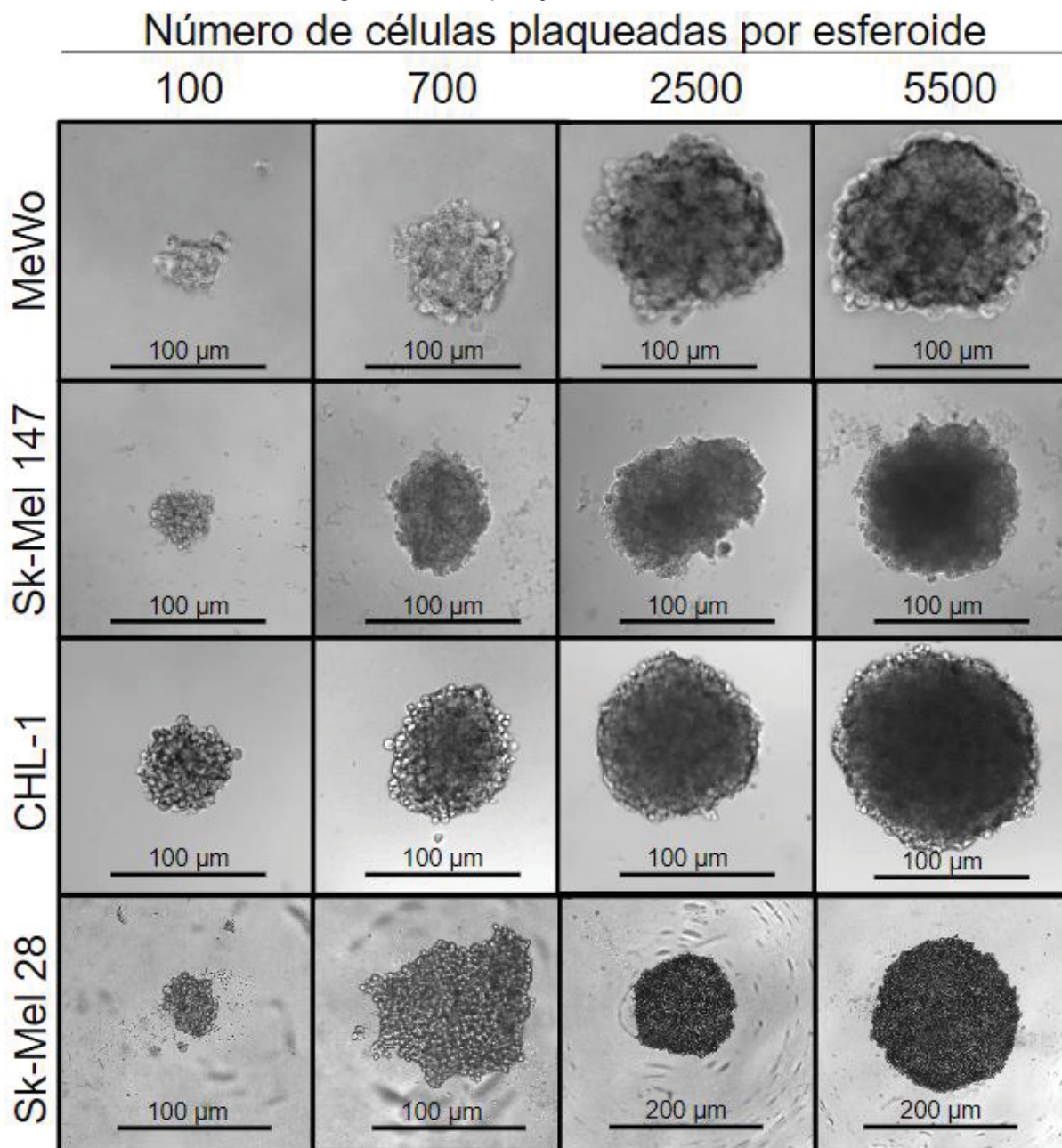
Com todos os esferoides obtidos, as tabelas 2, 3, 4 e 5 comparam os diâmetros das estruturas em monocultura e cocultura com os mesmos números de células. Dois padrões foram observados. Para as células Sk-Mel 147 e CHL-1, os esferoides em monocultura são maiores em diâmetro quando comparados aqueles em cocultura, o que é esperado, pois como consta nas imagens do ATCC a célula THP-1 é muito menor do que as células tumorais e já que ela faz parte do número total de células da estrutura, acaba tornando-a menor do que em monocultura. Entretanto, para as células Sk-Mel 28 e MeWo os esferoides em cocultura, em sua maioria, tem diâmetro superior aos de cocultura, o que pode estar relacionado com os macrófagos atuando como TAM, liberando fatores de crescimento associados com aumento da proliferação das células tumorais (DANDEKAR, KINGAONKAR; DHABEKAR, 2011).

Quando comparamos os modelos, podemos avaliar que as células Sk-Mel 147, CHL-1 e MeWo possuem esferoides com tamanhos semelhantes nas mesmas densidades celulares, diferentes da célula Sk-Mel 28, onde os esferoides possuem tamanho superior, nas mesmas densidades (Figura 23). Como esta célula possui mutação no gene da proteína BRAF esse aumento pode ser decorrente de uma maior comunicação entre as células além de sinais proliferativos mais exacerbados.

Uma vez com os modelos padronizados, buscamos avaliar o comportamento celular e para isso partimos de modelos bidimensionais, que são ponto de comparação com os esferoides. Para essa comparação usamos dois fármacos hoje

utilizados na clínica para o tratamento do melanoma, o vemurafenib e cobimetinib. O vemurafenib é uma terapia alvo, utilizada no tratamento do melanoma, que possui alta especificidade pela proteína BRAF gerada pela mutação V600E e o cobimetinib é um fármaco, utilizado no tratamento do melanoma, que possui alta especificidade e ação inibitória pelas proteínas MEK1/2, presentes na via de sinalização MAPk.

Figura 23 - Comparação dos esferoides obtidos



Fonte: O autor (2022)

Legenda: Esferoides representativos das 4 linhagens e de 4 das 20 densidades celulares testadas.

Imagens obtidas após 10 dias em condições de cultivo.

Uma importante medida quando se utiliza compostos *in vitro* é a determinação do valor de IC_{50} , que se baseia-se em utilizar diversas concentrações de um dado composto e avaliar qual concentração é capaz de produzir efeito inibitório sobre 50% das células. Esse é um método utilizado há muitas décadas e que auxilia na compreensão do efeito de diversos fármacos. Quanto maior o valor de IC_{50} maior é a concentração necessária do fármaco e menor é sua especificidade (Tabela 6).

Para o vemurafenib os valores de IC_{50} demonstram um padrão, levando em consideração a presença das principais mutações das células usadas. A célula Sk-Mel 28, que possui mutação no gene *BRAF* (do tipo V600E) e que faz com que a via esteja constitutivamente ativa levando ao aumento da proliferação e resistência a sinais apoptóticos (LOO et al., 2018), apresentou o menor valor de IC_{50} , quando comparada as outras linhagens. O valor foi de 0,1607 μM (Gráfico 1 A2), ficando próximo ao obtido por YANG e colaboradores (2010), que foi de 0,09 μM e por KRAYEM e colaboradores (2016) que, para quatro diferentes linhagens de melanoma humano com mutação *BRAF* V600E, ficou entre 0,05 e 0,1 μM .

Para as outras células os resultados foram de 10,35 μM para MeWo, que é modelo de mutação em *NF-1*, 13,22 μM para *CHL-1*, triplo negativa e 47,74 μM para *Sk-Mel 147* que possui mutação em *NRAS* (Figuras Gráfico 1 B2, C2 e D2). NIEHR e colaboradores (2011) demonstraram que uma célula triplo negativa com mutação em *CDKN2A* (assim como *CHL-1*) possui valor de IC_{50} de 12,2 μM para o vemurafenib, próximo ao visto para *CHL-1*. *CHL-1* e MeWo, apresentaram valores relativamente próximos e, avaliado que nenhuma possui mutação nas proteínas principais da via MAPk (RAS-RAF-MEK-ERK, sendo que *NF-1* é uma proteína reguladora da via), a ação do vemurafenib nessa via tende a ter um efeito menor, quando comparado a Sk-Mel 28. Já Sk-Mel 147, apresentou valor de IC_{50} 297 vezes maior que Sk-Mel 28. Esse alto valor pode ser explicado por dois fatores principais: o primeiro é que essa célula não possui mutação em *BRAF*, fazendo com que seja necessário uma concentração alta que dribles a especificidade do fármaco, fazendo com que ele passe a ter ação citotóxica; o segundo é que a proteína *NRAS* é transdutora de sinal para várias proteínas, como PI3K, família RalGDS, p120GAP, MEKK1, Rin1, AF-6, PKC-B e Nore1, que estão em outras vias de sinalização, que não a MAPk e que também estão associadas a proliferação e escape de apoptose e senescência, fazendo com que a

inibição de outras proteínas que não a própria NRAS tenha um efeito menor, pela sua maior resistência (CASTELLANO; DOWNWARD, 2010).

Na mesma linha, valores de IC_{50} obtidos para o cobimetinib seguiram o mesmo padrão visto para vemurafenib. A célula mais sensível foi a Sk-Mel 28, seguida por MeWo, CHL-1 e Sk-Mel 147 (Gráfico 1 A1, B1,C1 e D1 respectivamente). KOHTAMAKI e colaboradores (2022) avaliaram cobimetinib e trametinib, outro inibidor de MEK1/2 utilizando a escala de sensibilidade a drogas (DSS), parâmetro calculado a partir de valores como IC_{50} para avaliar o comportamento de células quando expostas a fármacos, onde quanto maior o valor de DSS mais sensível a célula é ao fármaco (OKUTACHI et al., 2021). Para ambos os fármacos foi vista uma menor sensibilidade de várias linhagens de melanoma humano com a mutação em NRAS observada na Sk-Mel 147 (WM825, Sk-Mel 2 e Sk-Mel 6) quando comparadas a linhagens com mutação em BRAF V600E (Sk-Mel 28, a mesma desse estudo, e WM165). O mesmo padrão foi observado, onde Sk-Mel 28 apresentou valor de IC_{50} para cobimetinib de 0,04395 μ M enquanto para Sk-Mel 147 é de 1,193 μ M. Nesse estudo também foi utilizada uma linhagem de melanoma humano triplo negativa (linhagem Bowes), mas como suas mutações são diferentes das encontradas na CHL-1, a comparação entre essas duas células não é exata. Para ela, foi observada maior resistência a ambos os fármacos comparada ao que foi observado para todas as outras linhagens de células, diferente do encontrado neste trabalho, onde a IC_{50} (1,0935 μ M) foi menor do que a encontrada para a linhagem de células Sk-Mel 147.

Com os valores de IC_{50} em mãos, os esferoides em monocultura e cocultura foram expostos aos inibidores. Os esferoides previamente obtidos foram expostos a 3 concentrações de vemurafenib e cobimetinib 2 dias após seu plaqueamento. As concentrações utilizadas foram a IC_{50} de cada célula, 1,6 e 60 μ M para vemurafenib e 0,44 e 1,5 μ M para cobimetinib (Tabela 6). As concentrações foram escolhidas levando-se em consideração os valores obtidos na IC_{50} bidimensional. Os menores valores (1,6 μ M de vemurafenib e 0,44 μ M de cobimetinib) foram utilizados pois são superiores ao valor de IC_{50} da célula com mutação em BRAF, mas inferiores ao valor determinado para todas as outras células, de forma a avaliar especificidade de ação para essas concentrações. Os maiores valores (60 μ M para vemurafenib e 1,5 μ M cobimetinib) foram usados para avaliar uma concentração superior a IC_{50} de todas as células do estudo, de forma a avaliar uma ação menos específica, geral para todas as

células. Como a adição dos inibidores causou alterações severas na estruturação dos esferoides, foi alterada a forma de medição, de diâmetro para área, já que a periferia do esferoide, quando com células soltas, torna dificultada a escolha de um único ponto de medição (como é necessário no cálculo de diâmetro) devida a perda da homogeneidade da borda da estrutura.

Todos os controles, expostos a concentração proporcional de DMSO (veículo dos inibidores) formaram esferoides como observado nos experimentos para obtenção das estruturas, com nenhuma ou poucas células soltas e formato circular característico, demonstrando que a concentração de DMSO utilizada não afeta a integridade do esferoide. Determinamos aqui como perda de células, estruturas vistas nas imagens que não fazer parte da estrutura tridimensional ou que, mesmo fazendo parte, causam uma alteração severa na estrutura geral do esferoide. Importante salientar ainda que a concentração de DMSO está de acordo com o preconizado pela *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)* para padronização de testes de citotoxicidade, que indica um volume máximo de 0,5% (v/v) de DMSO em cultura (NIEHS, 2006), onde em nosso caso foi de 0,3% (v/v).

Para a linhagem de células Sk-Mel 28 houve semelhança quando comparamos os resultados de mono e cocultura (Figura 19). Essa foi a única célula em que todos os esferoides expostos aos dois inibidores apresentaram diminuição estatisticamente significativa na área da imagem. Vale salientar que essa célula é a que apresenta mutação no gene *BRAF*, sendo então o alvo do vemurafenib, e é a linhagem de células que possui o menor valor de IC_{50} bidimensional para os dois inibidores, portanto adequando o modelo. Loureiro e colaboradores (2021) obtiveram resultados semelhantes ao expor células A375, melanoma humano também com mutação *BRAF V600E*, a 0,027 μM de vemurafenib, indicando que a diminuição da área ao expor ao inibidor é um indício de ação do fármaco, assim como também foi avaliado que tecido de melanoma humano primário com mutação *BRAF V600E*, também apresenta diminuição de área quando exposto tanto ao vemurafenib quanto ao cobimetinib (SEIDEL et al., 2019).

Com a análise das imagens obtidas para a linhagem de células Sk-Mel 147, foi observado que houve alteração na morfologia de todos os esferoides expostos aos inibidores (Figura 17). Os expostos ao cobimetinib apresentam diminuição

estatisticamente significativa da área da imagem comparada ao controle. Essa diminuição pode ser explicada pela provável perda de células, uma vez que é possível notar estruturas não mais ligadas ao esferoide em ambas as condições. Entretanto, os expostos ao vemurafenib apresentam alteração no tamanho, estatisticamente significativa apenas na monocultura, quando expostos a 1,6 μM do fármaco. As outras concentrações (IC_{50} e 60 μM) afetaram de forma severa a estrutura tridimensional, com diversas estruturas soltas e ainda apresentando borda totalmente irregular. Juntos, esses fatores induzem uma falsa resposta ao se medir unilateralmente as imagens, uma vez que não é encontrada diferença entre esses tratados e os controles. Todavia, deve-se levar em consideração que essas alterações morfológicas afetam a estrutura tridimensional. Estudo utilizando esferoides de células derivadas de melanoma humano de pacientes avaliou que, quando expostas a 2 μM binimetinib, um inibidor seletivo de MEK1, as estruturas apresentavam diminuição de área (RYABAYA et al., 2019). Por se tratar de uma concentração próxima à aqui utilizada e um composto com o mesmo alvo molecular que o cobimetinib, o achado no estudo vai de encontro com o aqui obtido. Outro estudo expôs diferentes células de melanoma humano derivadas de paciente com mutação em *NRAS* a 2 μM de vemurafenib e 50 μM de cobimetinib. Em 5 das 6 amostras testadas a ação sobre os esferoides foi maior quando exposto ao cobimetinib do que ao vemurafenib, indo de encontro com nossos resultados (FLØRENES et al., 2019).

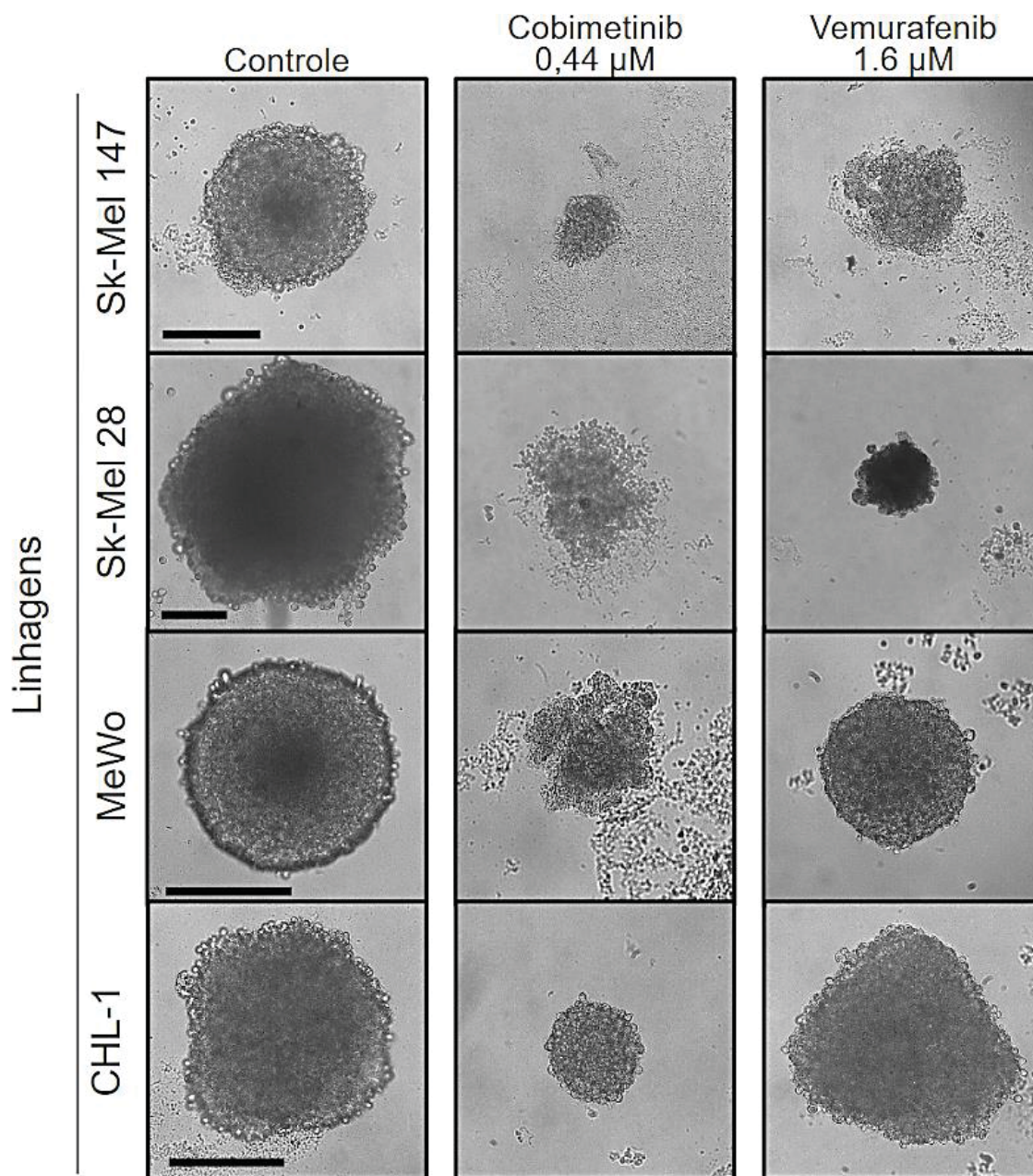
Para CHL-1 (Figura 21) todos os esferoides expostos ao cobimetinib apresentaram diminuição na área e, avaliando-se as imagens de cocultura, isso provavelmente ocorreu por perda de células uma vez que foram observadas muitas estruturas não ligadas aos esferoides. Os dois modelos ainda, quando expostos a 1,6 μM de vemurafenib, não apresentaram diminuição no tamanho, indicando a baixa especificidade dos fármacos para essa célula nessa concentração, como esperado por se tratar de valor muito inferior ao IC_{50} bidimensional e pelo fato da célula não apresentar mutações na via de sinalização em que o fármaco atua. Entretanto, nas outras concentrações de vemurafenib que diminuíram de forma estatisticamente significativa os esferoides (exceto a IC_{50} da cocultura), isso ocorreu por motivos diferentes. Enquanto na IC_{50} a diminuição aparenta ser por células soltas do esferoide, na concentração de 60 μM houve alteração severa na estrutura e morfologia do esferoide, indicando processo de morte celular nessas concentrações.

Por fim, para MeWo (Figura 15) em monocultura, comparando-se os esferoides expostos ao cobimetinib foi possível observar que as estruturas formadas apresentam tamanhos próximos entre si, porém estatisticamente menores que o controle. Nesse caso os esferoides apresentaram borda irregular e várias células soltas. O mesmo ocorreu na cocultura, contudo não houve significância estatística na concentração de 1,5 μM pelo fato de a desestruturação ter se tornado tão severa, comprometendo a análise da área pela imagem. Nesse caso é bastante evidente que houve mudança na conformação geral do esferoide quando comparado ao controle e, portanto, ocorreu interferência do fármaco. Para o vemurafenib as alterações nos esferoides foram concentração dependente. Na concentração de 1,6 μM da monocultura houve diminuição estatisticamente significativa na área, porém na cocultura não, mas ambos os grupos apresentam esferoides ainda circulares, com a estrutura parecida com a do controle. Na IC_{50} houve declínio no tamanho, quando comparado à concentração anterior, porém foi possível observar células soltas do esferoide em cocultura, demonstrando desestruturação. Com a concentração de 60 μM a desestruturação foi tão severa que na monocultura a estrutura geral do esferoide foi alterada, assim como para as outras células, com perda do formato circular e da integridade de ligação entre todas as células. Esse resultado foi ainda mais acentuado na cocultura, onde não foram observados esferoides, apenas algumas células dispersas sem ligação entre si.

Comparativamente, é possível confirmar a especificidade do vemurafenib, uma vez que seu efeito sobre a área dos esferoides foi estatisticamente significativo, diminuindo as estruturas de forma concentração dependente, apresentando poucas ou nenhuma célula solta, apenas na célula Sk-Mel 28, que é a célula com a mutação alvo da terapia alvo. Exceto a Sk-mel 147 e Sk-Mel 28, a cocultura de todas as outras células apresentou ação concentração dependente, onde apenas a maior concentração do vemurafenib diminuiu significativamente o esferoide. Já para o cobimetinib todas as células responderam com diminuição na área dos esferoides (exceto a maior concentração da cocultura da MeWo), demonstrando aqui a menor seletividade quando comparado ao vemurafenib. O cobimetinib, por agir indiscriminadamente sobre a proteína MEK1/2 tem menos seletividade, porém maior atividade, como vemos nos dados obtidos. Vemos ainda, ao comparar as imagens obtidas ao fim do experimento que para os esferoides em monocultura das células de

melanoma humano (Figura 24), que as células que possuem mutação na via MAPk (MeWo, Sk-Mel 28 e Sk-Mel 147) foram mais sensíveis a ambos os tratamentos, se tratando da morfologia geral da estrutura e presença ou não de células soltas. Enquanto isso a célula CHL-1, que não possui mutação nessa via, observamos diminuição do esferoide exposto ao Cobimetinib, mas não foi visto desestruturação com células soltas ou perda da esfericidade. Interessantemente e corroborando o observado no gráfico, quando avaliamos essas mesmas concentrações nos esferoides de cocultura podemos observar que a desestruturação nas células com mutação na via MAPk diminui drasticamente. Para todas elas, agora incluindo a CHL-1, se mantém diminuição na área do esferoide em comparação com o controle (Figura 25), mas essa alteração é menos acentuada do que a vista nos esferoides em monocultura, dando suporte a hipótese de que a adição dos macrófagos no modelo faz com que ele seja mais resistente a essas terapias.

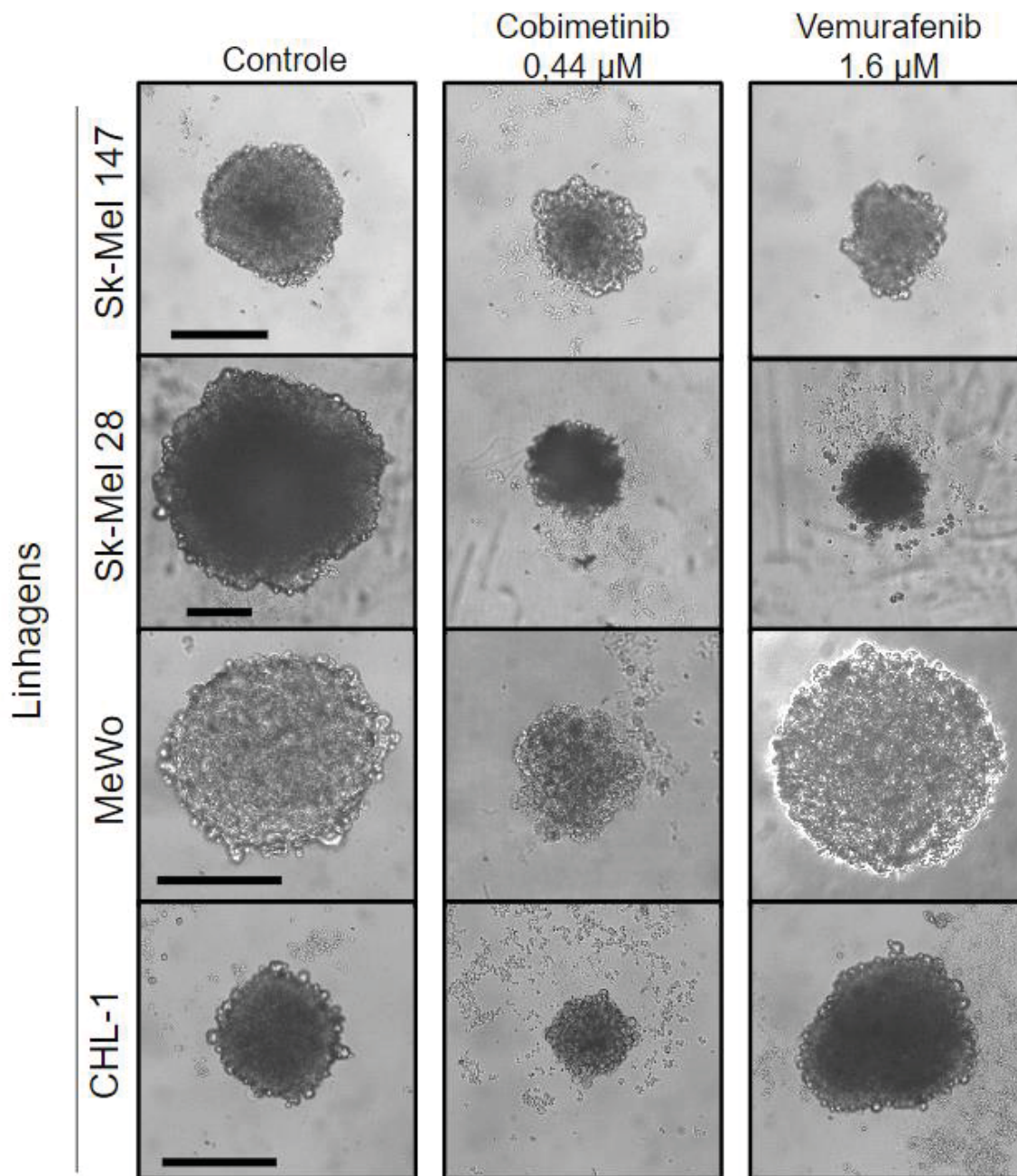
Figura 24 - Comparação dos esferoides em monocultura expostos aos inibidores



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Esferoide de células de melanoma humano expostos as terapias alvo Cobimetinib e Vemurafenib. Barra de escala = 50 μm .

Figura 25 - Comparação dos esferoides em cocultura expostos aos inibidores



Legenda: Esferoide de células de melanoma humano cocultivadas com macrófagos expostos as terapias alvo Cobimetinib e Vemurafenib. Barra de escala = 50 μm .

Concomitante a diminuição estatisticamente significativa de praticamente todos os esferoides expostos aos inibidores, é possível constatar, a partir da avaliação de marcação com calceína e PI, que essa diminuição provavelmente não se deu por processos relacionados à morte celular, uma vez que não há grandes diferenças nas marcações de PI dos tratados e dos controles, mas sim a diminuição da proliferação das células. A calceína é um composto capaz de atravessar membranas biológicas e

uma internalizada, esterases presentes no citosol são capazes de clivá-la tornando-a fluorescente. Contudo, o PI não é capaz de atravessar membranas integras, sendo somente internalizado em células que apresentam rompimento de membrana. Uma vez dentro da célula ele age como intercalante de DNA, marcando aquela célula. Assim, calceína é um composto que irá indicar células viáveis enquanto PI indica células em processo de morte, uma vez que falta de integridade de membrana é um indício disso. Vemurafenib e cobimetinib possuem atuação em pontos diferentes da via MAPk. Nessa via, é transmitida informação relativa à proliferação celular e, quando inibida a célula tende a proliferar menos (BOLLAG et al., 2012; RISSMANN; HESSEL; COHEN, 2015) e apenas altas doses do vemurafenib em células sensíveis a ele (com mutação em *BRAF*, por exemplo) estão relacionadas a aumento no processo de morte celular (FURFARO et al., 2019; SALAVAGGIONE; DUGGAN; CARSON, 201; TABOLACCI et al., 2021). Para que houvesse alteração nos sinais de morte celular os alvos proteicos teriam que estar relacionados a vias de sinalização voltadas a resistência à morte celular, como Rho/ROCK, WNT e PI3k (SHI; WEI, 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2011; CAVO et al., 2020; SONG et al., 2022). Assim, a resposta obtida, de que os esferoides expostos aos inibidores são menores que o controle, mas que essa diminuição não está relacionada a processos de morte celular vai de encontro com a literatura, demonstrando que os modelos obtidos se assemelham no comportamento celular que se espera para células expostas ao vemurafenib e o cobimetinib.

Comparando os resultados de monocultura e cocultura podemos avaliar que, exceto para a Sk-Mel 28 que sofreu alteração em seu tamanho em ambos os modelos, nas outras células a cocultura foi menos responsiva aos fármacos do que a monocultura, sendo necessária maiores doses, principalmente do cobimetinib, para apresentar efeito parecido com o visto na monocultura. Isso pode estar relacionado com várias funções que os macrófagos podem desempenhar no tecido tumoral. Já foi visto que macrófagos, quando associados ao tumor, estão relacionados com um perfil anti-inflamatório, que *in vivo* está relacionada com escape das células tumorais pelo sistema imune e ativação de vias de sinalização relacionadas a proliferação celular (REIS, 2018; KAKADIA et al., 2018; ATZORI et al., 2019). Já foi avaliado também que diversos tipos de tumor, entre eles o melanoma, podem apresentar resistência, mediada por vias de sinalização ativadas por citocinas de macrófagos, a terapias alvo

com inibidores de BRAF (WANG et al., 2015) e de MEK (CHEON et al., 2018; PATEL et al., 2021), como nos fármacos aqui utilizados, podendo esse ser um dos motivos na diferença de alteração dos tamanhos dos esferoides em mono e cocultura.

De uma forma geral obtivemos esferoides de monocultura e cocultura de Sk-Mel 28 utilizando a técnica de sensibilização de placa, de Sk-Mel 147 em *hanging drop*, de CHL-1 em matriz de baixa adesão, assim como para a monocultura da MeWo, sendo que sua cocultura foi em *hanging drop*. As células cultivadas de forma bidimensional e tridimensional se comportaram de forma parecida quando expostas aos inibidores vemurafenib e cobimetinib, com a célula Sk-Mel 28, que possui mutação em BRAF sendo a mais sensível a ambos. Vimos ainda que para todas as células aqui utilizadas os inibidores diminuíram o tamanho dos esferoides, mas, avaliando o ensaio de marcação com PI e calceína, há indício, que necessita ser melhor avaliado, de que essa alteração do tamanho se deu por alteração na proliferação celular e não por indução de morte mas, novamente, essa hipótese ainda precisa ser avaliada. Outra característica que carece de avaliação é determinar se as células de THP-1 estão presentes e viáveis nos modelos de cocultura ao longo do tempo e ainda se, mesmo diferenciadas, elas são capazes de se dividir dentro do esferoide.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram propostos 8 diferentes modelos de esferoides utilizando células de melanoma humano (representativos de diferentes padrões de mutações) em cocultura ou não com uma linhagem de macrófagos. Podemos concluir que obtivemos sucesso na obtenção dos modelos. Nos métodos utilizados pudemos obter uma estrutura tridimensional por poço/gota, com formato esférico, estável por pelo menos 10 dias em cultura e com poucas células soltas da estrutura. Juntas, essas características demonstram que os esferoides aqui descritos podem ser utilizados em diversos estudos comparativos, pelo fato de serem reprodutíveis.

Além disso concluímos que as estruturas aqui descritas, principalmente as formadas pelas células SK-Mel 28, são responsivas aos fármacos referência, demonstrando a correlação do modelo com o descrito na literatura podem ser tidos como representativos das características, pelo menos gerais, do melanoma humano. Esse trabalho se põe como o primeiro a determinar protocolos de modelos tridimensionais de melanoma humano que representam todos os subgrupos da classificação genômica da doença. Juntos, os modelos aqui propostos criam um painel representativo da diversidade genômica da doença e, em estudos que levam esse fator em consideração, pode ser utilizado para comparações e aferições de efeitos mediados por esse padrão de alteração genética.

Outros estudos podem ser realizados para validar algumas características dos esferoides aqui descritos e adequados. A presença, localização e caracterização dos macrófagos precisa ser avaliada, determinando-se fatores como taxa proliferativa e diferenciação. Uma vez determinada as características dos macrófagos, os modelos em cocultura poderão ser utilizados para avaliar compostos que agem via macrófagos, aumentando ainda mais o potencial de utilização desses.

REFERÊNCIAS

- ABRAMO, J. M. et al. Individuality in music performance. **Assessment & Evaluation in Higher Education**, v. 37, n. October, p. 435, 2012.
- ACHKAR, T.; TARHINI, A. A. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 88, 2017.
- ADRIANI, G.; PAVESI, A.; TAN, A. T.; et al. Microfluidic models for adoptive cell-mediated cancer immunotherapies. **Drug Discovery Today**, 2016.
- AHMED, F.; HAASS, N. K. Microenvironment-driven dynamic heterogeneity and phenotypic plasticity as a mechanism of melanoma therapy resistance. **Frontiers in Oncology**, 2018.
- AKBANI, R.; AKDEMIR, K. C.; AKSOY, B. A.; et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 2015.
- ALEXANDROV, L. B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 2013.
- ALON, M.; ARAFEH, R.; LEE, J. S.; et al. Correction: CAPN1 is a novel binding partner and regulator of the tumor suppressor NF1 in melanoma. **Oncotarget**, v. 10, n. 13, p. 1344, 2018.
- AMARAL, R. L. F. et al. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. AUG, 22 ago. 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. How is melanoma skin cancer treated? 2020.
- AN, S. et al. Indoor tanning and the risk of overall and early-onset melanoma and non-melanoma skin cancer: Systematic review and meta-analysis. **Cancers MDPI**, 1 dez. 2021.
- ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology**. **CellPress**. 2020.
- APALLA, Z.; NASHAN, D.; WELLER, R. B.; CASTELLSAGUÉ, X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Derm. and Therapy**, v. 7, p. 5–19, 2017.
- AREDO, J. V. et al. Tobacco Smoking and Risk of Second Primary Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 16, n. 6, p. 968–979, 1 jun. 2021.
- AREF, A. R.; CAMPISI, M.; IVANOVA, E.; et al. 3D microfluidic: Ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade. **Lab on a Chip**, 2018.
- ARIYAN, C. E.; BRADY, M. S.; SIEGELBAUM, R. H.; et al. Robust antitumor responses result from local chemotherapy and CTLA-4 Blockade. **Cancer Immunology Research**, 2018.
- ARNETH, B. Tumor microenvironment. **Medicina (Lithuania)**MDPI AG, , 1 jan. 2020.
- ASCIERTO, P. A.; KIRKWOOD, J. M.; GROB, J.-J.; et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 85, 2012.
- ATKINS M. B. et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. **J Clin Oncol**. n. 7. p. 2105-2116. 1999.
- ATZORI, M. G. et al. Role of VEGFR-1 in melanoma acquired resistance to the BRAF inhibitor vemurafenib. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 1, p. 465–475, 2020.

AU, G. G. et al. Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Cocksackievirus A21. **International journal of oncology**. [s.l: s.n.]. 2005.

AU, G. G. et al. Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Cocksackievirus A21. **International journal of oncology**. Int J Oncol. 2005.

AZIZIPOUR, N. et al. Uniform Tumor Spheroids on Surface-Optimized Microfluidic Biochips for Reproducible Drug Screening and Personalized Medicine. **Micromachines**, v. 13, n. 4, 2022.

AZIZIPOUR, N. et al. Uniform Tumor Spheroids on Surface-Optimized Microfluidic Biochips for Reproducible Drug Screening and Personalized Medicine. **Micromachines**, v. 13, n. 4, 2022.

BEAUMONT, K. A.; ANFOSSO, A.; AHMED, F.; WENINGER, W.; HAASS, N. K. Imaging- and flow cytometry-based analysis of cell position and the cell cycle in 3d melanoma spheroids. **Journal of Visualized Experiments**, 2015.

BENCI, J. L.; XU, B.; QIU, Y.; et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. **Cell**, 2016.

BENNER, B.; SCARBERRY, L.; SUAREZ-KELLY, L. P.; et al. Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, 2019.

BHATIA, P.; FRIEDLANDER, P.; ZAKARIA, E. A.; KANDIL, E. Impact of BRAF mutation status in the prognosis of cutaneous melanoma: An area of ongoing research. **Annals of Trans. Med.**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2015.

BÖHME, I.; BOSSERHOFF, A. K. Acidic tumor microenvironment in human melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, 2016.

BOLLAG, G. et al. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 11, p. 873–886, 2012.

BOLLAG, G. et al. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 11, p. 873–886, 2012.

BOSSHART, H.; HEINZELMANN, M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational. Medicine*, 1 nov. 2016.

BOTTI, G.; CERRONE, M.; SCOGNAMIGLIO, G.; et al. Microenvironment and tumor progression of melanoma: New therapeutic perspectives. **J. of Immunotox**, v. 10, n. 3, 2013.

BOURLAND, J.; FRADETTE, J.; AUGER, F. A. Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development. **Scientific Reports**, 2018.

BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

Brasil, Ministério da Saúde. **Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS**. Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>. 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria Nº 357, de 8 de abril de 2013**. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria Nº 357, de 8 de abril de 2020**. Brasília, 2020.

BU, M. T. et al. The roles of TGF- β and VEGF pathways in the suppression of antitumor immunity in melanoma and other solid tumors. *Pharmacology and Therapeutics* **Elsevier Inc.**, 2022.

BUCHBINDER, E. I.; DUTCHER, J. P.; DANIELS, G. A.; et al. Therapy with high-dose Interleukin-2 (HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 49, 2019.

CACHO-DÍAZ, B. et al. Tumor microenvironment differences between primary tumor and brain metastases. **Journal of Translational Medicine**. 2020.

CARBOGNIN, L.; PILOTTO, S.; MILELLA, M.; et al. Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (PD-L1): Sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers. **PLoS ONE**, 2015.

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**. 2020.

CARVALHO, L. A. C. et al. Redox-Related Proteins in Melanoma Progression. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2022.

CASTELLANO E; DOWNWARD, J. Role of RAS in the Regulation of PI 3-Kinase. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 2010.

CAVO, M. et al. A synergic approach to enhance long-term culture and manipulation of MiaPaCa-2 pancreatic cancer spheroids. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHES, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*. **Elsevier**, 2014.

CHEON, S. K. et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes resistance to MEK blockade in KRAS mutant colorectal cancer cells. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 8, p. 1398–1409, 2018.

CHUNG, H.; JUNG, H.; JHO, E. HOON; et al. Keratinocytes negatively regulate the N-cadherin levels of melanoma cells via contact-mediated calcium regulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2018.

CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.

CONDITIONS, S. HMCB [Human Melanoma Cell Bowes]. p. 1–6, [s.d.]. DAPHU, I. et al. In vitro treatment of melanoma brain metastasis by simultaneously targeting the MAPK and PI3K signaling pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8773–8794, 2014.

CORRÊA, F. DE M.; GUERRA, R. ZIMMERMANN, I. R. Terapia-alvo versus dacarbazina no tratamento de primeira linha do melanoma avançado não cirúrgico e metastático: análise de impacto orçamentário na perspectiva do Sistema Único de Saúde, 2018-2020. **revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, 2019.

CUI, X.; HARTANTO, Y.; ZHANG, H. Advances in multicellular spheroids formation. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 14, n. 127, p. 20160877, 2017.

CUKIER, P.; SANTINI, F. C.; SCARANTI, M.; HOFF, A. O. Endocrine side effects of cancer immunotherapy. **Endocrine-Related Cancer**, 2017.

DABBAGH, S. R. et al. Biomedical Applications of Magnetic Levitation. **Advanced NanoBiomed Research**, v. 2, n. 3, p. 2100103, 2022.

DANDEKAR, R. C.; KINGAONKAR, A. V.; DHABEKAR, G. S. Role of macrophages in malignancy. **Ann Maxillofac Surg**. 2011.

DAI, X. et al. Acetylation-dependent regulation of BRAF oncogenic function. **Cell Reports**, v. 38, n. 3, 2022.

DAPHU, I. et al. In vitro treatment of melanoma brain metastasis by simultaneously targeting the MAPK and PI3K signaling pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8773–8794, 2014.

DAS, T. et al. Empirical chemosensitivity testing in a spheroid model of ovarian cancer using a microfluidics-based multiplex platform. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 1, 2013.

DAS, T. et al. Empirical chemosensitivity testing in a spheroid model of ovarian cancer using a microfluidics-based multiplex platform. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 1, 2013.

DATASUS. Tecnologia da informação a serviço DO SUS (Sistema Único de Saúde). Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>, 2022.

DAVAR, D. et al. High-dose interleukin-2 (HD IL-2) for advanced melanoma: A single center experience from the University of Pittsburgh Cancer Institute. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2017.

DAVAR, D. et al. High-dose interleukin-2 (HD IL-2) for advanced melanoma: A single center experience from the University of Pittsburgh Cancer Institute. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2017.

DAVIS, E. J.; JOHNSON, D. B.; SOSMAN, J. A.; CHANDRA, S. Melanoma: What do all the mutations mean? **Cancer**, 2018.

DEVI, K. S. P. et al. Assessing the immunomodulatory role of heteroglycan in a tumor spheroid and macrophage co-culture model system. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 1–10, 2015.

DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35–49, 2018.

EDMONDSON, R.; BROGLIE, J. J.; ADCOCK, A. F.; YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, 2014.

EGGERMONT, A. M. M.; KIRKWOOD, J. M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? **European J. of Cancer**, v. 40, n. 12, 2004.

ELIADES, P. et al. A novel multi-CDK inhibitor P1446A-05 restricts melanoma growth and produces synergistic effects in combination with MAPK pathway inhibitors. **Cancer Biology and Therapy**, v. 17, n. 7, p. 778–784, 2016.

ELIADES, P. et al. A novel multi-CDK inhibitor P1446A-05 restricts melanoma growth and produces synergistic effects in combination with MAPK pathway inhibitors. **Cancer Biology and Therapy**, v. 17, n. 7, p. 778–784. 2016.

FECHER, L. A.; AMARAVADI, R. K.; FLAHERTY, K. T. The MAPK pathway in melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 20, n. 2, p. 183–189, 2008.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Inter. Journal of Cancer**, 2019.

FISCHER, G. M.; VASHISHT GOPAL, Y. N.; MCQUADE, J. L.; et al. Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 31, n. 1, p. 11–30, 2018.

FONTOURA, J. C.; VIEZZER, C.; DOS SANTOS, F. G. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Mat Sc. and Eng.: C**, v. 107, p. 2020.

- FRIEDMAN, A. A.; LETAI, A.; FISHER, D. E.; FLAHERTY, K. T. Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. **Nature R. Cancer**, v. 15, n. 12, p. 747–756, 2015.
- FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.
- FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.
- FUJIMURA, T. Stromal Factors as a Target for Immunotherapy in Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022.
- FURFARO, A. L. et al. HO-1 downregulation favors BRAFV600 melanoma cell death induced by Vemurafenib/PLX4032 and increases NK recognition. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 7, p. 1950–1962, 2020.
- FURFARO, A. L. et al. HO-1 downregulation favors BRAFV600 melanoma cell death induced by Vemurafenib/PLX4032 and increases NK recognition. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 7, p. 1950–1962, 2020.
- GATTAS, M. J. et al. A heterotypic tridimensional model to study the interaction of macrophages and glioblastoma in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10. 2021.
- GHIASVAND, R. et al. Indoor Tanning and Melanoma Risk: Long-Term Evidence from a Prospective Population-Based Cohort Study. **American Journal of Epidemiology**. 2017.
- GIAVINA-BIANCHI, M. H.; GIAVINA-BIANCHI JUNIOR, P. F.; FESTA NETO, C. Melanoma: Tumor microenvironment and new treatments. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2017.
- GONÇALVES J. P. et al. Beyond gold nanoparticles cytotoxicity: Potential to impair metastasis hallmarks. **Euro J of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 2020.
- GONÇALVES, M. A. et al. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae A review of breast cancer aspects and its diagnosis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 2019
- GOYAL, R.; MACRI, L. K.; KAPLAN, H. M.; KOHN, J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 2016.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.
- GRIMALDI, A. M. et al. MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors. **American Journal of Clinical Dermatology**. 2017.
- GUHAN, S. M. et al. The Molecular Context of Vulnerability for CDK9 Suppression in Triple Wild-Type Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 8, p. 2018- 2027.e4, 1 ago. 2021.
- GUHAN, S. M. et al. The Molecular Context of Vulnerability for CDK9 Suppression in Triple Wild-Type Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 8, p. 2018- 2027.e4. 2021.
- GÜNDEL, B. et al. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Preclinical in vitro and ex vivo Models. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. **Frontiers Media S.A.**, 22 out. 2021.
- GÜNDEL, B. et al. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Preclinical in vitro and ex vivo Models. **Frontiers in Cell and Developmental**. **Biology Frontiers Media S.A.** 2021.
- GUO, Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**. 2020.

GUO, Y.; ZHANG, X.; ZENG, W.; et al. TRAF6 activates fibroblasts to cancer-associated fibroblasts (CAFs) through FGF19 in tumor microenvironment to benefit the malignant phenotype of melanoma cells. **Society for Investigative Dermatology**, 2020.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1–19, 2021.

HANAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov.** v. 12 n. 1. p. 31–46. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. HASSE, S. et al. Plasma treatment limits human melanoma spheroid growth and metastasis independent of the ambient gas composition. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 1–19, 1 set. 2020.

HARIDAS, P.; BROWNING, A. P.; MCGOVERN, J. A.; SEAN MCELWAIN, D. L.; SIMPSON, M. J. Three-dimensional experiments and individual based simulations show that cell proliferation drives melanoma nest formation in human skin tissue. **BMC Systems Biology**, 2018.

HARTMAN, M. L. Non-Apoptotic Cell Death Signaling Pathways in Melanoma. **International Journal of Molecular Science**, 2020.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–23, 2014.

HASSE, S. et al. Plasma treatment limits human melanoma spheroid growth and metastasis independent of the ambient gas composition. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 1–19. 2020.

HAYWARD, N. K.; WILMOTT, J. S.; WADDELL, NICOLA; et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. **Nature**, v. 545, n. 7653, p. 175–180, 2017.

HELGADOTTIR, H.; TROCOLI DRAKENSJÖ, I. R.; GIRNITA, A. Personalized medicine in malignant melanoma: Towards patient tailored treatment. **Frontiers in Oncology**, 2018.

HILL, D. S.; ROBINSON, N. D. P.; CALEY, M. P.; et al. A Novel Fully Humanized 3D Skin Equivalent to Model Early Melanoma Invasion. **Mol Cancer Ther.**, v. 14, n. 11, p. 2665–2673, 2015.

HIRATA, A. S. et al. Seriniquinones as therapeutic leads for treatment of BRAF and NRAS mutant melanomas. **Molecules**, v. 26, n. 23. 2021.

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

HIRT, C.; PAPADIMITROPOULOS, A.; MELE, V.; et al. “In vitro” 3D models of tumor-immune system interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2014.

HOFSCHROËR, V.; KOCH, K. A.; LUDWIG, F. T.; et al. Extracellular protonation modulates cell-cell interaction mechanics and tissue invasion in human melanoma cells. **Sc. Reports**, 2017.

HOSSEINI, A.; GHARIBI, T.; MAROFI, F.; BABALOO, Z.; BARADARAN, B. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. **International Immunopharmacology**, 2020.

HSIEH, Y. W. et al. Depletion of alpha-melanocyte-stimulating hormone induces insatiable appetite and gains in energy reserves and body weight in Zebrafish. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, 1 ago. 2021.

HSU, M. Y.; MEIER, F. E.; NESBIT, M.; et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **American Journal of Pathology**, 2000.

IBARRA, L. E. et al. Exploiting cellular delivery of conjugated polymer nanoparticles for improved photodynamic therapy in a 3D glioblastoma model. **SPIE-Intl Soc Optical Eng.** 2019.

IESSI, E.; LOGOZZI, M.; LUGINI, L.; et al. Acridine orange/exosomes increase the delivery and the effectiveness of acridine orange in human melanoma cells: A new prototype for theranostics of tumors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. O que é câncer? | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/>>. 2022.

JACKETT, L. A.; SCOLYER, R. A. A review of key biological and molecular events underpinning transformation of melanocytes to primary and metastatic melanoma. **Cancers**, 2019.

JANG, S. D. et al. Anti-cancer activity profiling of chemotherapeutic agents in 3D co-cultures of pancreatic tumor spheroids with cancer-associated fibroblasts and macrophages. **Cancers**, v. 13, n. 23. 2021.

JAROSZ-BIEJ, M.; KAMIŃSKA, N.; MATUSZCZAK, S.; et al. M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, 2018.

JENKINS, R. W.; SULLIVAN, R. J. NRAS mutant melanoma: an overview for the clinician for melanoma management. **Melanoma Management**, 2016.

JENSEN, T. O. et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American joint committee on cancer stage I/II melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 20, p. 3330–3337, 2009.

JEONG, Y. M. et al. 3D-Printed Collagen Scaffolds Promote Maintenance of Cryopreserved Patients-Derived Melanoma Explants. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2021.

JEONG, Y. M. et al. 3D-Printed Collagen Scaffolds Promote Maintenance of Cryopreserved Patients-Derived Melanoma Explants. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2021.

JORGE, N. A. N.; CRUZ, J. G. V.; PRETTI, M. A. M.; et al. Poor clinical outcome in metastatic melanoma is associated with a microRNA-modulated immunosuppressive tumor microenvironment. **Journal of Translational Medicine**, 2020.

JOYCE, J. A.; FEARON, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. **Science**, 2015.

KAINULAINEN, K. et al. M1 macrophages induce pro-tumor inflammation in melanoma cells via TNFR–NF-κB signaling. **Journal of Investigative Dermatology**. 2022.

KAKADIA, S. et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of us food and drug administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 7095–7107, 2018.

KAPALCZYŃSKA, M. et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 910–919, 2018.

KATT, M. E.; PLACONE, A. L.; WONG, A. D.; XU, Z. S.; SEARSON, P. C. In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2016.

KAUR, G. et al. Complex Tumor Spheroids, a Tissue-Mimicking Tumor Model, for Drug Discovery and Precision Medicine. **SLAS Discovery**, v. 26, n. 10, p. 1298–1314, 2021.

KAUR, G. et al. Complex Tumor Spheroids, a Tissue-Mimicking Tumor Model, for Drug Discovery and Precision Medicine. **SLAS Discovery**, v. 26, n. 10, p. 1298–1314, 2021.

KAZANTSEVA, J.; IVANOV, R.; GASIK, M.; NEUMAN, T.; HUSSAINOVA, I. Graphene-Augmented Nanofiber Scaffolds Trigger Gene Expression Switching of Four Cancer Cell Types. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, 2018.

KE, Y.; WANG, X. J. TGF β Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. **Journal of Investigative Dermatology**. 2021.

KIM, C.; LEE, C. W.; KOVACIC, L.; et al. Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide. **The Oncologist**, v. 15, n. 7, p. 765–771, 2010.

KIM, H. et al. Personalized functional profiling using ex-vivo patient-derived spheroids points out the potential of an antiangiogenic treatment in a patient with a metastatic lung atypical carcinoid. **Cancer Biology and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 96–102, 2022.

KIM, H. et al. Personalized functional profiling using ex-vivo patient-derived spheroids points out the potential of an antiangiogenic treatment in a patient with a metastatic lung atypical carcinoid. **Cancer Biology and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 96–102, 2022.

KIM, J. H.; PARK, J. Y.; JIN, S.; et al. A microfluidic chip embracing a nanofiber scaffold for 3D cell culture and real-time monitoring. **Nanomaterials**, 2019.

KLEIN, A. P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. 2021.

KNÖSPEL, F.; JACOBS, F.; FREYER, N.; et al. In vitro model for hepatotoxicity studies based on primary human hepatocyte cultivation in a perfused 3D bioreactor system. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016.

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.

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, 7 set. 2019.

KOHTAMÄKI, L. et al. High-throughput ex vivo drug testing identifies potential drugs and drug combinations for NRAS-positive malignant melanoma. **Translational Oncology**, v. 15, n. 1, 2022.

KOHTAMÄKI, L. et al. High-throughput ex vivo drug testing identifies potential drugs and drug combinations for NRAS-positive malignant melanoma. **Translational Oncology**, v. 15, n. 1, 2022.

KOZAR, I. et al. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer** B.V. 2019.

KRAMER, G.; WEGDAM, W.; DONKER-KOOPMAN, W.; et al. Elevation of glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B in type 1 Gaucher disease patients and mouse models. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 9, p. 902–913, 2016.

KRAYEM, M. et al. P53 Reactivation by PRIMA-1Met (APR-246) sensitises V600E/KBRAF melanoma to vemurafenib. **European Journal of Cancer**, v. 55, p. 98–110, 2016.

KRAYEM, M. et al. P53 Reactivation by PRIMA-1Met (APR-246) sensitises V600E/KBRAF melanoma to vemurafenib. **European Journal of Cancer**, v. 55, p. 98–110, 2016.

KROSCHINSKY F. Intensive Care in Hematological and Oncological Patients (iCHOP) Collaborative Group. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. **Crit Care**. v. 14 n. 21. 2017.

KROSCHINSKY, F.; STÖLZEL, F.; VON BONIN, S. New drugs, new toxicities: Severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. **Critical Care**, 2017.

KRUEGER, S. et al. Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture - Regulation of cathepsin B expression and invasiveness. **Cancer Letters**, v. 223, n. 2, p. 313–322. 2005.

KUEN, J. Influence of 3D tumor cell/fibroblast co-culture on monocyte differentiation and tumor progression in pancreatic cancer. Tese (Doutorado em ciências naturais) - Julius-Maximilians University Würzburg. 2017.

KUEN, J.; DAROWSKI, D.; KLUGE, T.; MAJETY, M. Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. **P ONE**, 2017.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, 2018.

LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: State of the art. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 1 mar. 2008.

LEE, S.; RAUCH, J.; KOLCH, W. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1102, 2020.

LEIGHT, J. L.; TOKUDA, E. Y.; JONES, C. E.; LIN, A. J.; ANSETH, K. S. Multifunctional bioscaffolds for 3D culture of melanoma cells reveal increased MMP activity and migration with BRAF kinase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sc. of the USA**, 2015.

LI, J.; YANG, R.; YANG, H.; et al. NCAM regulates the proliferation, apoptosis, autophagy, EMT, and migration of human melanoma cells via the Src/Akt/mTOR/cofilin signaling pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 1192–1204, 2019.

LI, K.; XIAO, G.; RICHARDSON, J. J.; et al. Targeted Therapy against Metastatic Melanoma Based on Self-Assembled Metal-Phenolic Nanocomplexes Comprised of Green Tea Catechin. **Advanced Science**, 2019.

LI, X. et al. Reactive oxygen species reprogram macrophages to suppress antitumor immune response through the exosomal miR-155-5p/PD-L1 pathway. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, 1 dez. 2022.

LIAO, F.; YANG, X. Optimization and evaluation of an inflammatory cell model in LPS-stimulated PMA-differentiated THP-1 cells. **Chinese journal of cellular and molecular immunology**. 2017.

LIN, Y.; XU, J.; LAN, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications. **Journal of Hematology and Oncology**, 2019.

LIU, C. et al. Silencing TCF4 sensitizes melanoma cells to vemurafenib through inhibiting GLUT3-mediated glycolysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 4905–4915, 2020.

LIU, C. et al. Silencing TCF4 sensitizes melanoma cells to vemurafenib through inhibiting GLUT3-mediated glycolysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 4905–4915, 2020.

LIU, H.; LU, T.; KREMERS, G. J.; SEYNHAEVE, A. L. B.; TEN HAGEN, T. L. M. A microcarrier-based spheroid 3D invasion assay to monitor dynamic cell movement in extracellular matrix. **Biological Procedures Online**, 2020.

LOEB, L. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. **Nat Rev Cancer**. v. 11 p. 450–457 2011.

LONG, L.; YIN, M.; MIN, W. 3D Co-culture System of Tumor-associated Macrophages and Ovarian Cancer Cells. **BIO-PROTOCOL**, 2018.

LOO, E. et al. BRAF V600E Mutation Across Multiple Tumor Types: Correlation between DNA-based Sequencing and Mutation-specific Immunohistochemistry. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 26, n. 10, p. 709–713, 2018.

LOO, E. et al. BRAF V600E Mutation Across Multiple Tumor Types: Correlation between DNA-based Sequencing and Mutation-specific Immunohistochemistry. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 26, n. 10, p. 709–713, 2018.

MACDONALD, E. J. Epidemiology of melanoma. **Progress in clinical cancer**, v. 6, p. 139–149, 1975.

MAESS, M. B. et al. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. **Journal of Immunological Methods**, v. 402, n. 1–2, p. 76–81, 2014.

MAHONEY, K. M.; FREEMAN, G. J.; MCDERMOTT, D. F. The next immune-checkpoint inhibitors: Pd-1/pd-l1 blockade in melanoma. **Clinical Therapeutics**, 2015.

MALONE, E. R.; OLIVA, M.; SABATINI, P. J. B.; STOCKLEY, T. L.; SIU, L. L. Molecular profiling for precision cancer therapies. **Genome Medicine**, v. 12, n. 1, p. 8, 2020.

MALYARENKO, O. S. et al. Fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* potentiates the anti-proliferative efficacy of asterosaponins from starfish *Asteropsis carinifera* in 2D and 3D models of melanoma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 31–39. 2021.

MALYARENKO, O. S. et al. Fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* potentiates the anti-proliferative efficacy of asterosaponins from starfish *Asteropsis carinifera* in 2D and 3D models of melanoma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 31–39. 2021.

MAMBELLI-LISBOA, N. C. et al. Co-Localization of Crotamine with Internal Membranes and Accentuated Accumulation in Tumor Cells. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.

MAMBELLI-LISBOA, N. C. et al. Co-Localization of Crotamine with Internal Membranes and Accentuated Accumulation in Tumor Cells. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.

MANZANO, J. L. et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1–9. 2016.

MARZAGALLI, M.; EBELT, N. D.; MANUEL, E. R. Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, 2019.

MASTRACCI, L.; FONTANA, V.; QUEIROLO, P.; et al. Response to ipilimumab therapy in metastatic melanoma patients: potential relevance of CTLA-4+ tumor infiltrating lymphocytes and their in situ localization. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 4, p. 653–662, 2020.

MAZURKIEWICZ, J. et al. Melanoma cells with diverse invasive potential differentially induce the activation of normal human fibroblasts. **Cell Communication and Signaling**, v. 20, n. 1. 2022.

MENA, E.; SANLI, Y.; MARCUS, C.; SUBRAMANIAM, R. M. Precision Medicine and PET/Computed Tomography in Melanoma. **PET Clinics**, 2017.

MENGUS, C.; MURARO, M. G.; MELE, V.; et al. In Vitro Modeling of Tumor–Immune System Interaction. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 2, p. 314–323, 2018.

MICHEEL, C. M. et al. American Association for Cancer Research Project Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange: From Inception to First Data Release and Beyond—Lessons Learned and Member Institutions' Perspectives. **American Society of Clinical Oncology**. 2018.

MILLARD, M.; YAKAVETS, I.; ZORIN, V. Drug delivery to solid tumors: The predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening. **Inter. J of Nanomed**, 2017.

MILLER, K. D.; NOGUEIRA, L.; MARIOTTO, A. B.; et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019.

MIYAKE, M.; HORI, S.; MORIZAWA, Y.; et al. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. **Neoplasia (United States)**, 2016.

MORAN, B.; SILVA, R.; PERRY, A. S.; GALLAGHER, W. M. Epigenetics of malignant melanoma. **Seminars in Cancer Biology**, v. 51, p. 80–88, 2018.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; ELIZABETH PATTON, E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development (Cambridge)**, 2015.

MUKHERJEE, S. Genomics-Guided Immunotherapy for Precision Medicine in Cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 34, n. 8, p. 487–497, 2019.

MÜLLER, I.; KULMS, D. A 3D organotypic melanoma spheroid skin model. **Journal of Visualized Experiments**, 2018.

NACIONAL, C. et al. Chamada INCT – CNPq nº 58/2022. 2022. NIEHR, F. et al. Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 1–13, 2011.

NATIONAL HEALTH INSTITUTE (NIH). Nacional Cancer Institute. Disponível em <<https://www.cancer.gov/>>. 2022

NAVES, L. B.; ALMEIDA, L.; RAMAKRISHNA, S. Understanding the Microenvironment of Melanoma Cells for the Development of Target Drug Delivery Systems. **Citation: EMJ Oncol**, 2017.

NIEHR, F. et al. Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 1–13, 2011.

NISSAN, M. H. et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. **Cancer Research**, v. 74, n. 8, p. 2340–2350, 2014.

NISSAN, M. H. et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. **Cancer Research**, v. 74, n. 8, p. 2340–2350, 2014.

NUNES, A. S.; BARROS, A. S.; COSTA, E. C.; MOREIRA, A. F.; CORREIA, I. J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, 2019.

OKOCHI, M.; MATSUMURA, T.; HONDA, H. Magnetic force-based cell patterning for evaluation of the effect of stromal fibroblasts on invasive capacity in 3D cultures. **Bios. and Bioelectronics**, 2013.

OKUTACHI, S. et al. A Covalent Calmodulin Inhibitor as a Tool to Study Cellular Mechanisms of K-Ras-Driven Stemness. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. July, p. 1–17, 2021.

OKUTACHI, S. et al. A Covalent Calmodulin Inhibitor as a Tool to Study Cellular Mechanisms of K-Ras-Driven Stemness. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. 7, p. 1–17, 2021.

OLBRYT, M. Molecular background of skin melanoma development and progression: Therapeutic implications. **Postepy Dermatologii i Alergologii**. 2019.

PATEL, M. et al. Resistance to molecularly targeted therapies in melanoma. **Cancers**, v. 13, n. 5, p. 1–26, 2021.

PATHRIA, G.; GARG, B.; WAGNER, C.; et al. RanBP3 Regulates Melanoma Cell Proliferation via Selective Control of Nuclear Export. **J. of Inv. Dermatol**, v. 136, n. 1, 2016.

PAULI, C.; HOPKINS, B. D.; PRANDI, D.; et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 5, p. 462–477, 2017.

PELSTER, M. S.; AMARIA, R. N. Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 11, p. 175883591983082, 2019.

PELUSO, I.; YARLA, N. S.; PASTORE, G.; PERRY, G. MAPK signalling pathway in cancers: Olive products as cancer preventive and therapeutic agents. **S. in Can Bio**, v. 56, 2019.

PIENIAZEK, M.; MATKOWSKI, R.; DONIZY, P. Macrophages in skin melanoma-the key element in melanomagenesis (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 5399–5404, 2018.

PIENIAZEK, M.; MATKOWSKI, R.; DONIZY, P. Macrophages in skin melanoma-the key element in melanomagenesis (Review). **Oncology Letters**, 2018.

PIETRA, G.; MANZINI, C.; RIVARA, S.; et al. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. **Cancer Research**, 2012.

PIZZURRO, G. A. et al. 3d model of the early melanoma microenvironment captures macrophage transition into a tumor-promoting phenotype. **Cancers**, v. 13, n. 18, 1 set. 2021.

POLLACK, M. S. et al. Forty-six on Alloantigen Expression Cell Lines 1.2 Human HLA-A. **JNCI**, v. 66, n.6. 1981

POLLACK, M. S. et al. **Forty-six on Alloantigen Expression Cell Lines 1.2 Human HLA-A, Cultured.**

POTU, H.; PETERSON, L. F.; KANDARPA, M.; et al. Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma. **Nature Co.**, v. 8, n. 1, 2017.

PRASAD, S.; RAMACHANDRAN, S.; GUPTA, N.; KAUSHIK, I.; SRIVASTAVA, S. K. Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 4, p. 165424, 2019.

PRATHAP, M. U. A.; RODRÍGUEZ, C. I.; SADAK, O.; et al. Ultrasensitive electrochemical immunoassay for melanoma cells using mesoporous polyaniline. **Chemical Communications**, 2018.

PRENDERGAST, M. E.; BURDICK, J. A. Recent Advances in Enabling Technologies in 3D Printing for Precision Medicine. **Advanced Materials**, v. 32, n. 13, p. 2516, 2020.

PUDELKO, K. et al. Increased Microtubule Growth Triggered by Microvesicle-mediated Paracrine Signaling is Required for Melanoma Cancer Cell Invasion. **Cancer Research Communications**, v. 2, n. 5, p. 366–379. 2022.

PUDELKO, K. et al. Increased Microtubule Growth Triggered by Microvesicle-mediated Paracrine Signaling is Required for Melanoma Cancer Cell Invasion. **Cancer Research Communications**, v. 2, n. 5, p. 366–379. 2022.

QIAN, P.; LINBO, L.; XIAOMEI, Z.; HUI, P. Circ_0002770, acting as a competitive endogenous RNA, promotes proliferation and invasion by targeting miR-331-3p in melanoma. **Cell death and d.**, v. 11, n. 264, 2020.

QUADRI, M. et al. Activation of cGMP-Dependent Protein Kinase Restricts Melanoma Growth and Invasion by Interfering with the EGF/EGFR Pathway. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 142, n. 1, p. 201–211. 2022.

QUADRI, M. et al. Activation of cGMP-Dependent Protein Kinase Restricts Melanoma Growth and Invasion by Interfering with the EGF/EGFR Pathway. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 142, n. 1, p. 201–211. 2022.

QUATRESOOZ, P.; REGINSTER, M. A.; PIÉRARD, G. E. "Malignant melanoma microecosystem": Immunohistopathological insights into the stromal cell phenotype (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**. 2011.

QUATRESOOZ, P.; REGINSTER, M. A.; PIÉRARD, G. E. "Malignant melanoma microecosystem": Immunohistopathological insights into the stromal cell phenotype (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**. 2011.

QUEIROLO, P.; PICASSO, V.; SPAGNOLO, F. Combined BRAF and MEK inhibition for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. **Cancer Treatment Reviews**, 2015.

QUEIROLO, P.; SPAGNOLO, F. Binimetinib for the treatment of NRAS-mutant melanoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 17, n. 11, p. 985–990. 2017.

RAGHAVAN, S. et al. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 13. 2015.

RAGHAVAN, S. et al. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. **Oncotarget**. 2016.

RAINERI, A.; FASOLI, S.; CAMPAGNARI, R.; GOTTE, G.; MENEGAZZI, M. Onconase restores cytotoxicity in dabrafenib-resistant A375 human melanoma cells and affects cell migration, invasion, and colony formation capability. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

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

REBELO, S. P.; PINTO, C.; MARTINS, T. R.; et al. 3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment. **Biomaterials**, 2018.

REIS, E. M. DO.; BERTI, F. V.; COLLA, G.; PORTO, L. M. 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**, 2018.

REISFELD, R. A.; PELLEGRINO, M. A. Cell surface antigens **Journal of Chromatography Library**. 2020

REISFELD, R. A.; PELLEGRINO, M. A. Cell surface antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 73, n. 9, pp. 3278-3282. 1976.

RENGIFO, A. F. C.; STEFANES, N. M.; TOIGO, J.; et al. PEO-chitosan nanofibers containing carboxymethyl-hexanoyl chitosan/dodecyl sulfate nanoparticles loaded with pyrazoline for skin cancer treatment. **European Polymer Journal**, 2019.

RIEDL, A.; SCHLEDERER, M.; PUDELKO, K.; et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. **J. of Cell Sci**, 2017.

RISSMANN, R.; HESSEL, M. H. M.; COHEN, A. F. Vemurafenib/dabrafenib and trametinib. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 4, p. 765–767, 2015.

ROBINSON, J. I. et al. Affimer proteins inhibit immune complex binding to FcγRIIIa with high specificity through competitive and allosteric modes of action. **PNAS**. 2017.

SACHINDRA et al. New role of ID3 in melanoma adaptive drug-resistance. **Oncotarget**, v. 8, n. 66, p. 110166–110175, 2017.

SACHINDRA et al. New role of ID3 in melanoma adaptive drug-resistance. **Oncotarget**, v. 8, n. 66, p. 110166–110175, 2017.

- SAGWAL, S. K. et al. Combination of chemotherapy and physical plasma elicits melanoma cell death via upregulation of SLC22A16. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 12. 2018.
- SAGWAL, S. K. et al. Combination of chemotherapy and physical plasma elicits melanoma cell death via upregulation of SLC22A16. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2018.
- SAHA, K.; AGASTI, S. S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739–2779, 2012.
- SALAVAGGIONE, G. N. O.; DUGGAN, M. C.; OHIO, C. Agent in Malignant Melanoma. v. 28, n. 5, p. 390–397, 2019.
- SALTARI, A.; TRUZZI, F.; QUADRI, M.; et al. CD271 Down-Regulation Promotes Melanoma Progression and Invasion in Three-Dimensional Models and in Zebrafish. **J. of Inv Dermatol**, 2016.
- SAMPLE, A.; HE, Y. Y. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**. 2018.
- SANTARPIA, L.; LIPPMAN, S. M.; EL-NAGGAR, A. K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. 1, 2012.
- SARKISIAN, S.; DAVAR, D. MEK inhibitors for the treatment of NRAS mutant melanoma. Drug Design, Development and Therapy **Dove Medical Press**. 2018.
- SCATENA, C.; MURTAS, D.; TOMEI, S. Cutaneous Melanoma Classification: The Importance of High-Throughput Genomic Technologies. **Frontiers in Oncology**. 2021.
- SCHÄFER, M. E. A. et al. 3D Melanoma Cocultures as Improved Models for Nanoparticle-Mediated Delivery of RNA to Tumors. **Cells**, v. 11, n. 6. 2022.
- SCHÄFER, M. E. A. et al. 3D Melanoma Cocultures as Improved Models for Nanoparticle-Mediated Delivery of RNA to Tumors. **Cells**, v. 11, n. 6. 2022.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.
- SCHRÖDER, J.; SCHUMACHER, U.; BÖCKELMANN, L. C. Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) Is Differentially Expressed in Human Tumor Samples but Is Absent in Human Tumor Cell Line Xenografts: Implications for Its Use as an Immunosurveillance Marker. **Cancers (Basel)**. 2020
- SHAFREN, D. R. et al. Systemic Therapy of Malignant Human Melanoma Tumors by a Common Cold-Producing Enterovirus, Coxsackievirus A21. **Clinical Cancer Research**. v. 10. p. 53–60. 2004.
- SHAFREN, D. R. et al. Systemic Therapy of Malignant Human Melanoma Tumors by a Common Cold-Producing Enterovirus, Coxsackievirus A21. **Clin Cancer Res**. 2004
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.
- SHANNAN, B.; PEREGO, M.; SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Cancer Treatment and Research: Melanoma. **Cancer Treatment and Research**, v. 167, p. 107–129, 2016.
- SHARMA, A. et al. Vemurafenib Targeted Inhibition of Mutated BRAF for Treatment of Advanced Melanoma and Its Potential in Other Malignancies. **Drugs**. 2012
- SHAUGHNESSY, M. et al. Selective uveal melanoma inhibition with calcium channel blockade. **International Journal of Oncology**, v. 55, n. 5, p. 1090–1096, 2019.

- SHAUGHNESSY, M. et al. Selective uveal melanoma inhibition with calcium channel blockade. **International Journal of Oncology**, v. 55, n. 5, p. 1090–1096, 2019.
- SHEIKH, T. N. et al. Targeted inhibition of glutaminase as a potential new approach for the treatment of NF1 associated soft tissue malignancies. **Oncotarget**, v. 8 n. 55. 2017.
- SHI, J.; WEI, L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 2, p. 61–75, 2007.
- SHI, J.; WEI, L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 2, p. 61–75, 2007.
- SHOVAL, H. et al. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- SHOVAL, H. et al. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1. 2017.
- SINI, M. C.; DONEDDU, V.; PALIOGIANNIS, P.; et al. Genetic alterations in main candidate genes during melanoma progression. **Oncotarget**, v. 9, n. 9, p. 8531–8541, 2018.
- SKOBOWIAT, C.; OAK, A. S. W.; KIM, T. K.; et al. Noncalcemic 20-hydroxyvitamin D3 inhibits human melanoma growth in in vitro and in vivo models. **Oncotarget**, 2017.
- SMALLEY, K. S. M. et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 9, p. 2876–2883, 2008.
- SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M.; WAGNER, S. N. The role of tumor microenvironment in melanoma therapy resistance. **Melanoma Management**, v. 3, n. 1, p. 23–32, 2016.
- SONG, Y. et al. Targeting RAS–RAF–MEK–ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials. **Genes & Diseases**, n. xxxx, p. 1–13, 2022.
- SPAGNOLO, F. et al. BRAF-mutant melanoma: Treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. **OncoTargets and Therapy**. 2015.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA**, v. 71, n. 3. 2021.
- SWEENEY, J. G.; LIANG, J.; ANTONOPOULOS, A.; et al. Loss of GCNT2/l-branched glycans enhances melanoma growth and survival. **Nature Communications**, 2018.
- TABOLACCI, C. et al. Melanoma cell resistance to vemurafenib modifies inter-cellular communication signals. **Biomedicines**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2021.
- TANNER, K.; GOTTESMAN, M. M. Beyond 3D culture models of cancer. **Sci T. Med**, 2015.
- TAS, F.; ERTURK, K. BRAF V600E mutation as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 2, 2020.
- THURBER, A. E.; DOUGLAS, G.; STURM, E. C.; et al. Inverse expression states of the BRN2 and MITF transcription factors in melanoma spheres and tumour xenografts regulate the NOTCH pathway. **Onc**, 2011.
- TIERSMA, J. F. et al. Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibition by Dichloroacetate in Melanoma Cells Unveils Metabolic Vulnerabilities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, 2022.
- TIERSMA, J. F. et al. Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibition by Dichloroacetate in Melanoma Cells Unveils Metabolic Vulnerabilities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, 2022.

- TOFANI, L. B. et al. Generation of a Three-Dimensional in Vitro Ovarian Cancer Co-Culture Model for Drug Screening Assays. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 7, p. 2629–2636. 2021.
- TROUSIL, S. et al. Phenformin Enhances the Efficacy of ERK Inhibition in NF1-Mutant Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 5, p. 1135–1143. 2017.
- TSANG, M.; QUESNEL, K.; VINCENT, K.; et al. Insights into Fibroblast Plasticity. **The American Journal of Pathology**, v. 190, n. 1, p. 206–221, 2020.
- VINET, L.; ZHEDANOV, A. A “missing” family of classical orthogonal polynomials. **Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical**, v. 44, n. 8, 2011.
- VOGEL, C. J. et al. Cooperative induction of apoptosis in NRAS mutant melanoma by inhibition of MEK and ROCK. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 3, p. 307–317. 2015.
- VOILLET, V. et al. A faithful in vivo model of human macrophages in metastatic melanoma. **bioRxiv**, p. 2021.09.09.459682. 2021.
- VOTANOPOULOS, K. I. et al. Model of Patient-Specific Immune-Enhanced Organoids for Immunotherapy Screening: Feasibility Study. **HHS**. v. 27, n. 6, p. 1956–1967, 2021.
- VOTANOPOULOS, K. I.; FORSYTHE, S.; SIVAKUMAR, H.; et al. Model of Patient-Specific Immune-Enhanced Organoids for Immunotherapy Screening: Feasibility Study. **A. of S. Oncol**, 2019.
- WANG, C. et al. DNA methylation-based biomarkers of age acceleration and all-cause death, myocardial infarction, stroke, and cancer in two cohorts: The NAS, and KORA F4. **EBioMedicine**, v. 63. 2021.
- WANG, M.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, 2017.
- WANG, T. et al. BRAF inhibition stimulates melanoma-associated macrophages to drive tumor growth. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1652–1664, 2015.
- WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. **The Journal of General Physiology**, v. 8, n. 6, p. 519–530, 1927.
- WESSELS, D.; LUSCHE, D. F.; VOSS, E.; et al. Melanoma cells undergo aggressive coalescence in a 3D Matrigel model that is repressed by anti-CD44. **PLoS ONE**, 2017.
- WICKLEIN, D. et al. CEACAM1 promotes melanoma metastasis and is involved in the regulation of the EMT associated gene network in melanoma cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1. 2018.
- WICKLEIN, D. et al. CEACAM1 promotes melanoma metastasis and is involved in the regulation of the EMT associated gene network in melanoma cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1. 2018.
- WILSON, M. A.; SCHUCHTER, L. M. Chemotherapy for Melanoma. **CTR**, 2016.
- WOODBURY, R. G.; BROWN, J. P.; YEH, M. Y.; HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K. E. Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1980.
- WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **C. Letters**, v. 387, 2017.
- XIA, Y. et al. Acoustic Droplet-Assisted Superhydrophilic-Superhydrophobic Microarray Platform for High-Throughput Screening of Patient-Derived Tumor Spheroids. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 13, n. 20, p. 23489–23501, 2021.

- XIA, Y. et al. Acoustic Droplet-Assisted Superhydrophilic-Superhydrophobic Microarray Platform for High-Throughput Screening of Patient-Derived Tumor Spheroids. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 13, n. 20, p. 23489–23501, 2021.
- XIE, P. et al. Multicellular tumor spheroids bridge the gap between two-dimensional cancer cells and solid tumors: The role of lipid metabolism and distribution. **Chinese Chemical Letters**, 2022.
- XIN, X.; YANG, H.; ZHANG, F.; YANG, S. T. 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. **Process Biochemistry**, 2019.
- XING, F.; SAIDOU, J.; WATABE, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. **Front Biosci.** v.15. p. 166–179. 2011.
- YADAV, B. et al. Quantitative scoring of differential drug sensitivity for individually optimized anticancer therapies. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–10, 2014.
- YAN, Y.; LEONTOVICH, A. A.; GERDES, M. J.; et al. Understanding heterogeneous tumor microenvironment in metastatic melanoma. **PLoS ONE**, 2019.
- YANG, H. et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. **Cancer Research**, v. 70, n. 13, p. 5518–5527, 2010.
- YANG, H. et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. **Cancer Research**, v. 70, n. 13, p.
- YANG, O. C. Y.; LOH, S.-H. Acidic Stress Triggers Sodium-Coupled Bicarbonate Transport and Promotes Survival in A375 Human Melanoma Cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6858, 2019.
- YUAN, Y. et al. Dual VEGF/PDGF knockdown suppresses vasculogenic mimicry formation in choroidal melanoma cells via the Wnt5a/ β -catenin/AKT signaling pathway. **Acta Histochemica**, v. 124, n. 1. 2022.
- 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**. 2016.
- ZHANG, B.; MA, S.; RACHMIN, I.; et al. Hyperactivation of sympathetic nerves drives depletion of melanocyte stem cells. **Nature**, v. 577, n. 7792, p. 676–681, 2020.
- ZHANG, S. et al. Deletion of IKK β in activated fibroblasts promotes tumor progression in melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 621, p. 46–52. 2022.
- ZHANG, T. Y.; HUANG, B.; WU, H. BIN; et al. Synergistic effects of co-administration of suicide gene expressing mesenchymal stem cells and prodrug-encapsulated liposome on aggressive lung melanoma metastases in mice. **Journal of Controlled Release**, 2015.
- ZHU, L. F.; ZHENG, Y.; FAN, J.; et al. A novel core-shell nanofiber drug delivery system intended for the synergistic treatment of melanoma. **European J. of Pharmaceutical Sciences**, 2019.
- ZUBIRI, L.; ALLEN, I. M.; TAYLOR, M. S.; et al. Immune-Related Adverse Events in the Setting of PD-1/L1 Inhibitor Combination Therapy. **The Oncologist**, 2020.

1. ANEXO I - PREPARO DA AGAROSE

Materiais e equipamentos:

- Água ultrapura (UP, 13,3 MΩ.cm a 25°C);
- Água destilada;
- Detertec;
- Peróxido de hidrogênio;
- Agarose em pó LE;
- Barca média para pesagem;
- Balança de precisão;
- Garrafa de vidro de 200 mL com tampa plástica rosqueável;
- EPI 'S (máscara, jaleco, luvas e óculos de proteção);
- Forno de micro-ondas.

Antes do preparo:

- Um dia antes do preparo, lave a garrafa de vidro;
- Ensaboar a garrafa e tampa com detertec diluído 1:10;
- Enxaguar 10 vezes com água da torneira;
- Enxaguar 2 vezes com água destilada;
- Preparar solução de peróxido 7%;
- Adicione a solução de peróxido na garrafa, feche bem e agite por 5 minutos;
- Descartar a solução de peróxido do interior das vidrarias
- Lavar 2 vezes com água destilada
- Lavar 2 vezes com água ultrapura

Preparo:

A agarose deve sempre ser preparada pelo menos 1 dia antes do plaqueamento

- Como a agarose é um pó que forma uma poeira fina é necessária proteção correta de mãos, olhos e boca;

- calibre corretamente a balança e tare a barca de pesagem;
- Adicione a quantidade adequada de agarose, lembrando sempre de preencher no máximo 50% do recipiente escolhido:

-

Volume garrafa	Total solução	Agarose 2%	Agarose 0,5%
100 mL	50 mL H ₂ O UP	1g	0,25g
200 mL	100 mL H ₂ O UP	2g	0,5g

- Transfira a agarose pesada para a garrafa e adicione o volume correto de H₂O UP. Para recolher todo pó que venha ficar na barca de pesagem, jogue a água dentro dela antes de levar o líquido à garrafa;
- Tampe bem a garrafa, agite levemente e leve ao forno de micro-ondas por aproximadamente 5 ciclos de 30 segundos em potência máxima (até todas as partículas de dentro da garrafa deixarem de ser visíveis - **CUIDADO**: ao final desta etapa a garrafa estará muito quente!
- Espere esfriar (cerca de 30 minutos) e guarde a garrafa fechada na geladeira. Utilize apenas a partir do dia posterior ao preparo.

2. ANEXO II - TÉCNICA DA SENSIBILIZAÇÃO DE PLACA

Materiais e equipamentos:

- Forno de micro-ondas;
- Cabine de segurança biológica com luz UV;
- Agarose 0,5% (v/v);
- Placa de cultivo estéril de 96 poços de poliestireno com fundo em U sem tratamento para cultura;
- Pipeta multicanal de 200 μ L;
- Reservatório coxinho estéril de 50 mL para multicanal;
- Ponteiras de 200 μ L estéreis.

Preparação da placa:

- Limpe e esterilize todos os materiais;
- Acondicione a placa de 96 poços, pipeta multicanal, coxinho e ponteiras dentro da cabine de segurança biológica;
- Após tudo acondicionado, leve a garrafa de agarose bem fechada ao forno de micro-ondas, em ciclos de 30 segundos em potência máxima, até que a agarose esteja totalmente liquefeita (**OBSERVAÇÃO:** a agarose estará própria para o uso quando, após agitar a garrafa, não subir bolhas de ar do fundo);

Após liquefeita, a agarose deve ser utilizada rapidamente!

- Com cuidado, pois a garrafa estará quente, leve-a a cabine de segurança biológica;
- Transfira a agarose rapidamente para o coxinho;
- Com a pipeta multicanal adicione 200 μ L da agarose em cada poço da placa de 96. Assim que dispensar o líquido, remova-o de volta, de forma a permanecer apenas uma fina camada recobrimo as paredes e o fundo do poço;
- Repita o processo em todos os poços;
- Após completar a placa, mantenha-a destampada dentro da cabine de segurança biológica com a luz UV ligada por 30 minutos para esterilização e gelificação da agarose;

- A placa deve ser usada até 1 hora após o período sob UV, para evitar o ressecamento da agarose com conseqüentes modificações superficiais e adesão celular;
- Adicione a quantidade desejada de células;
- Manter a placa em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Em nossos testes foi possível manter esferoides em cultura por até 15 dias.

3. ANEXO III - PLAQUEAMENTO EM MATRIZ DE BAIXA ADESÃO

Materiais e equipamentos:

- Forno de micro-ondas;
- Cabine de segurança biológica com luz UV;
- Agarose 2% (v/v);
- Placa de cultivo de 96 poços estéril;
- Pipeta multicanal de 200 μ L;
- Reservatório coxinho estéril de 50 mL para multicanal;
- Ponteiras de 200 μ L estéreis.

Preparação da placa:

- Limpe e esterilize todos os materiais;
- Acondicione a placa de 96 poços, pipeta multicanal, coxinho e ponteiras dentro da cabine de segurança biológica;
- Ajuste a pipeta multicanal para 70 μ L - **ATENÇÃO:** É necessário que seja utilizada uma pipeta/ponteiras com limite mínimo de 200 μ L, para garantir que a agarose não danifique o equipamento;
- Após tudo acondicionado, leve a garrafa de agarose bem fechada ao forno de micro-ondas, em ciclos de 30 segundos, até que a agarose esteja totalmente liquefeita (**OBSERVAÇÃO:** a agarose estará própria para o uso quando, após agitar a garrafa, não subam bolhas de ar do fundo);

Após liquefeita, a agarose deve ser utilizada rapidamente!

- Com cuidado, pois a garrafa estará quente, leve-a cabine de segurança biológica;
- Transfira a agarose rapidamente para o coxinho;
- A adição de 70 μ L da agarose a placa é realizada através de retropipetagem, devido à alta viscosidade do líquido: pressione a pipeta até o segundo estágio do êmbolo, pipete até soltar totalmente o êmbolo e adicione aos poços da placa, encostando a ponta da ponteira no fundo e liberando o conteúdo, pressionando o êmbolo apenas até o primeiro estágio;
- Repita o processo nos outros poços;

- Após completar a placa, mantenha-a destampada dentro da cabine de segurança biológica com a luz UV ligada por 30 minutos para esterilização e gelificação da agarose;
- A placa deve ser usada até 1 hora após o período sob UV, para evitar o ressecamento da agarose com consequente modificações superficiais e adesão celular;
- Adicione a quantidade desejada de células;
- Manter a placa em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Em nossos testes foi possível manter esferoides em cultura por até 15 dias.

4. ANEXO IV - TÉCNICA DO *HANGING DROP*

Materiais:

- Cabine de segurança biológica com luz UV;
- Placas de Petri estéreis de poliestireno;
- Pipeta de 100 μL ;
- Ponteiras de 200 μL estéreis;
- Tubo com dispersão de células em meio de cultivo completo previamente desaderidas de acordo com seu protocolo específico;
- PBS (pH entre 7,1 e 7,3) estéril a 37 °C;
- Placa de matriz de baixa adesão (descrita no anexo III);
- Pipeta Pasteur de 5 mL de plástico estéril.

Técnica:

- Em cabine de segurança biológica, prepare a dispersão de células de acordo com seu protocolo específico;
- Ajuste a concentração da dispersão de células de forma que a quantidade de células esperadas para cada esferoide esteja em 15 μL de meio de cultivo (Exemplo: esferoide de 1000 células - dispersão deve estar a $6,66 \times 10^4$ / mL ou $0,1 \times 10^4$ / 15 μL);
- Abra a placa de Petri e deixe o interior da tampa voltado para cima. É nessa região que serão adicionadas as gotas. **ATENÇÃO:** o plaqueamento deve acontecer o mais rápido possível para evitar a adesão celular ao plástico;
- Adicione as gotas de 15 μL no interior da tampa. Pipete a dispersão, se aproxime da placa, libere a gota de forma que ela permaneça na pipeta e delicadamente encoste a gota no plástico, sem encostar a ponteira;
- Repita o processo para obter a quantidade de esferoides desejada;
- Na parte inferior da placa de Petri adicione PBS suficiente para cobrir todo o fundo;
- tampe a placa de Petri, de forma que as gotas fiquem suspensas e mantenha em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO_2 até a formação dos esferoides (dois dias);
- Prepare uma placa de matriz de baixa adesão como descrito no anexo III.

- Adicione 185 μL de meio de cultura completo em cada poço da placa de matriz de baixa adesão. Com a pipeta Pasteur, pipete uma pequena quantidade (cerca de 50 μL) desse meio e utilize-o para pegar o esferoide na gota do *hanging drop*. Solte vagarosamente o meio sobre a gota recolha novamente todo o volume, agora com o esferoide;
- Volte o meio de cultivo, agora com o esferoide, para o poço da placa de matriz de baixa adesão. O esferoide então estará pronto para experimentação;
- Manter a placa em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO_2 . Em nossos testes foi possível manter esferoides em cultura por até 15 dias (tempo total desde o *hanging drop*).