

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

**Estabelecimento de modelo de carcinoma *in situ* para estudos de  
microambiente tumoral *in vitro***

**LEILANE DE SOUSA MENDONÇA**

**MANAUS**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

**Estabelecimento de modelo de carcinoma *in situ* para estudos de  
microambiente tumoral *in vitro***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de doutorado em Inovação Farmacêutica

**LEILANE DE SOUSA MENDONÇA**

**Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos**  
**Coorientadora: Ana Paula Negreiros Nunes Alves**

**MANAUS**

**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M539e Mendonça, Leilane de Sousa  
Estabelecimento de modelo de carcinoma in situ para estudos de microambiente tumoral in vitro / Leilane de Sousa Mendonça . 2023  
108 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos  
Coorientadora: Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cultura 3D. 2. esferoides. 3. câncer de pele. 4. pele artificial. 5. hidroxitingenona. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


“Estabelecimento de modelo de carcinoma in situ para estudos demicroambiente tumoral  
in vitro”

**DISCENTE: LEILANE DE SOUSA MENDONÇA**

PARECER:


Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM,29/06/2023.


Documento assinado digitalmente  
 EMERSOM SILVA LIMA  
Data: 09/08/2023 09:52:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Emersom Silva Lima  
Coordenador do PPGIF


**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:**

Documento assinado digitalmente  
 MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS  
Data: 03/08/2023 16:34:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos  
Orientadora e Presidente da banca

Documento assinado digitalmente  
 MARIA FULGENCIA COSTA LIMA BANDEIRA  
Data: 08/08/2023 16:21:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira  
Membro (UFAM)

Documento assinado digitalmente  
 RAQUEL CARVALHO MONTENEGRO  
Data: 04/08/2023 15:37:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro  
Membro (UFC)

Documento assinado digitalmente  
 FERNANDO ANDRE CAMPOS VIANA  
Data: 07/08/2023 18:51:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fernando André Campos Viana  
Membro (UNIFOR)

Documento assinado digitalmente  
 PATRICIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE  
Data: 07/08/2023 18:55:40-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Patricia Melchionna Albuquerque  
Membro (UEA)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por guiar meus passos e decisões tornando tudo isso possível;

À minha família, em especial aos meus pais Adenilde Bentes de Sousa e João Batista Pinto de Sousa, minha irmã Gabriela Bentes, minha sobrinha linda e amável Ágatha Bentes, meus avós Antônia Pereira Bentes Filha e Adanir de Oliveira Ferreira, meu esposo Rafael Mendonça, cujo amor, apoio e sacrifício foram a base sólida sobre a qual construí este trabalho. Vocês foram minha inspiração constante;

Aos meus amigos e colegas de pesquisa do BIOPHAR, laboratórios de apoio, que compartilharam comigo a paixão pelo conhecimento e que sempre estiveram dispostos a ajudar nos momentos de desafio;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marne Carvalho de Vasconcellos e coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Negreiros, Prof. Dr. Emerson Silva Lima, cujas orientações, sabedoria e incentivos foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional;

Aos participantes da minha pesquisa e colegas de laboratório (BIOPHAR), cuja colaboração e contribuições foram essenciais para o sucesso deste estudo;

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À CAPES, FAPEAM e CNPq pelo apoio financeiro;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas por toda a infraestrutura disponibilizada e apoio;

Esta tese é dedicada a todos vocês com profundo agradecimento e reconhecimento. O apoio e encorajamento de cada um de vocês foram a força motriz por trás deste trabalho.

**Obrigada!**

## RESUMO

Os modelos de cultura celular tridimensional *in vitro* estão cada vez mais conhecidos e aplicáveis nos laboratórios de pesquisa, devido a sua capacidade de mimetizar as estruturas semelhantes dos tecidos, em comparação aos modelos de cultura celular bidimensional em monocamada. Na investigação do câncer tem se tornado modelos úteis para investigar o microambiente tumoral, estágios do câncer e na pesquisa de novos alvos terapêuticos. Nesse sentido, este estudo visa contribuir com a validação de um modelo *in vitro* de carcinoma *in situ* para o estudo do microambiente tumoral e avaliar sua aplicabilidade para pesquisas de novas terapias anticâncer. Foram desenvolvidos dois modelos com linhagem celular de Carcinoma de Células Escamosas (CCE): CCE-*Skin*, e CCE *In situ*-*Skin*, sendo este último desenvolvido com esferoides tumorais acrescentados na pele experimental. Estudos da morfologia foram utilizados para avaliar a estrutura e presença das células nos modelos. Para os estudos de aplicabilidade, a 22- $\beta$ hidroxitingenona (22-HTG) foi selecionada quanto aos aspectos relacionados a citotoxicidade e invasão celular. Os resultados apontam que o modelo HaCat-*Skin* é um modelo em potencial para estudos de irritação e permeação em modelo de pele reconstruída *in vitro*. Os esferoides de carcinoma de células escamosas foram desenvolvidos com melhor morfologia após 10 dias de cultivo utilizando os micromoldes. A 22- $\beta$ hidroxitingenona apresentou citotoxicidade nos modelos sem célula tumoral e com células tumorais, e os modelos permitiram a determinação da atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz após os sete dias de cultivo, bem como, no método de zimografia *in situ*. Os resultados obtidos são relevantes para o avanço da pesquisa na área da cultura celular tridimensional e podem contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias para estudo do câncer e novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Cultura 3D, esferoides, câncer de pele, pele artificial, hidroxitingenona.

## ABSTRACT

Three-dimensional in vitro cell culture models are becoming increasingly well-known and applicable in research laboratories due to their ability to mimic tissue-like structures compared to two-dimensional monolayer cell culture models. In cancer research, they have become valuable tools for investigating the tumor microenvironment, cancer stages, and the exploration of new therapeutic targets. In this regard, this study aims to contribute to the validation of an in vitro carcinoma in situ model for the study of the tumor microenvironment and to assess its suitability for anticancer therapy research. Two models were developed using squamous cell carcinoma cell lines: CCE-Skin and CCEinsitu-Skin, with the latter incorporating tumor spheroids into the experimental skin. Morphological studies were conducted to evaluate the structure and presence of cells in the models. For applicability studies, 22- $\beta$ -hydroxytingenone (22-HTG) was selected based on cytotoxicity and cell invasion aspects. The results indicate that the HaCat-Skin model shows potential for irritation and permeation studies in in vitro reconstructed skin models. The squamous cell carcinoma spheroids exhibited improved morphology after 10 days of culture using micromolds. 22- $\beta$ -hydroxytingenone demonstrated cytotoxicity in both models with and without tumor cells, and the models allowed for the determination of matrix metalloproteinase proteolytic activity after seven days of culture, as well as through the in situ zymography method. The obtained results are relevant for advancing research in the field of three-dimensional cell culture and may contribute to the development of new methodologies for cancer study and novel therapeutic approaches.

Keywords: 3D culture, spheroids, skin cancer, artificial skin, hidroxitingenone.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Métodos alternativos ao uso de animais em experimentação: marcos históricos e aspectos legais.....	18
2.2 Modelos tridimensionais de cultura celular .....	21
2.3 Carcinoma de células escamosas e métodos alternativos ao uso de animais na experimentação .....	24
2.4 Pesquisa de novos fármacos a partir de fontes naturais.....	29
2.5 Microambiente tumoral .....	33
3 OBJETIVOS .....	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos .....	37
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 Cultura celular .....	38
4.2 Geração das peles humanas reconstruídas <i>in vitro</i> .....	39
4.3 Ensaio de irritação cutânea <i>in vitro</i> .....	40
4.4 Ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> .....	43
4.5 Geração dos esferoides tumorais .....	44
4.6 Análise dos esferoides.....	46
4.7 Cinética de crescimento dos esferoides.....	47
4.8 Ensaio de viabilidade celular dos esferoides .....	47
4.9 Análise do centro necrótico dos esferoides.....	48
4.10 Geração do modelo de carcinoma de células escamosas <i>in situ</i> (CCE <i>insitu</i> - <i>Skin</i> ).....	48
4.11 Avaliação da aplicabilidade dos modelos CCE- <i>Skin</i> e CCE <i>insitu</i> - <i>Skin</i> .....	49
4.11.1 Substâncias .....	49
4.11.2 Ensaio de viabilidade celular .....	50



4.11.3 Análise morfológica dos tecidos.....	51
4.11.4 Zimografia em gel de poliacrilamida .....	51
4.11.5 Zimografia in situ .....	52
4.12 Análise estatística.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.1 Padronização da HaCat-Skin e aplicação para ensaios de irritação .....	53
5.2 Ensaio de permeação em modelo de pele humana reconstruída .....	58
5.3 Formação dos esferoides de CAL27.....	61
5.4 Análise do diâmetro dos esferoides e cinética de crescimento .....	64
5.5 Capacidade dos esferoides em reduzir a resazurina e tratamento com a 22- βhidroxitingenona .....	67
5.6 Análise do centro necrótico.....	72
5.7 Estabelecimento dos modelos 3D com carcinoma de células escamosas .....	77
5.8 Viabilidade celular nos modelos HaCat-Skin, CCE-Skin e CCE- <i>In situ</i> .....	80
5.9 Avaliação da atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz por zimografia em gel .....	82
5.10 Zimografia in situ .....	84
6 CONCLUSÃO .....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
ANEXO I.....	104
ANEXO 2.....	108

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição proporcional dos principais tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por gênero para o Brasil. Adaptada de: BRASIL, 2022c.....26
- Figura 2 – Estrutura química da cisplatina. ....31
- Figura 3 – Estrutura química da 22 $\beta$ -hidroxitingenona. ....33
- Figura 4 - Estágios de desenvolvimento tumoral e sua correlação com o microambiente tumoral. Durante a transição para displasia pré-maligna o epitélio torna-se hiperplásico e a progressão para um carcinoma resulta em aumento da proliferação celular juntamente com um estroma tumoral ativado, os componentes da matriz são degradados, fibroblastos se diferenciam resultando na expressão de fatores de crescimento, componentes da matriz e proteases degradantes. Com a progressão do tumor, as células tendem a se infiltrar nos tecidos originando a metástase. Adaptado de: MUELLER; FUSENIG, 2004. ....34
- Figura 5 - Representação dos modelos de pele normal (*HaCat-Skin*), com carcinoma de células escamosas (*CCE-Skin*) e com esferoide de carcinoma de células escamosas *in situ* (*CCEinsitu-Skin*). Fonte: A autora. ....38
- Figura 6: Geração dos esferoides de CAL27 utilizando moldes micrométricos de tamanho 9x9, com diâmetro de 800  $\mu$ m, que se encaixam em placas de 12 poços (3D Petri Dish®, MicroTissues Inc., St. Louis, MO, USA). A: Aplicação da agarose nos moldes; B: Retirada da agarose dos moldes e transferência para placas de 12 poços; C: Moldes no interior dos poços da placa; D: Adição de células no interior do molde de agarose. ....46
- Figura 7: Cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina do modelo de pele humana reconstruída com linhagens celulares de fibroblasto humano (MRC5) e queratinócito humano (HaCat) – *HaCat-Skin*. Barras de escala: 100 $\mu$ m e 25 $\mu$ m. ....54
- Figura 8: Resultados do ensaio de irritação cutânea em modelo de pele humana reconstruída com linhagem celular de queratinócitos humano e fibroblastos humanos embebidos em colágeno tipo I (*HaCat-Skin*). Foram testadas cinco substâncias reconhecidamente não-irritantes (5) e irritantes (6) segundo as diretrizes da OECD. O modelo de pele conseguiu diferenciar as substâncias não-irritantes (viabilidade celular acima de 50%) e as irritantes (viabilidade celular abaixo de 50%). Valor de p: (\*\*) p<0.01 (\*\*\*) p<0.001 e (\*\*\*\*) p<0.0001.....55
- Figura 9: Permeação cutânea *in vitro* da cafeína em modelo de pele humana reconstruída *Hacat-Skin*. A: Permeação expressa em percentual da dose de cafeína presente no fluido receptor versus tempo em minutos. B: Permeação da cafeína expressa em  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> de pele presente no fluido receptor versus tempo em minutos. ....59
- Figura 10: Monitoramento do crescimento dos esferoides gerados no modelo de placa de 96 poços recobertos com agarose. A: Diferentes concentrações de células testadas

por poço; B: Acompanhamento diário da formação dos esferoides iniciados com 3000 células por poço; C: Imagens dos esferoides com a identificação do diâmetro após 10 dias de cultivo iniciados com 3000 células por poço. Imagens capturadas utilizando microscópio Primovert Carl Zeiss. Barra de escala 50 µm. ....62

Figura 11: Esferoides de CAL27 formados após 7 dias de cultivo utilizando moldes micrométricos de tamanho 9x9, com diâmetro de 800 µm, que se encaixam em placas de 12 poços (3D Petri Dish®, MicroTissues Inc., St. Louis, MO, USA). A: Esferoides formados em molde de agarose visualizados no poço de uma placa com 12 poços. B: Esferoide de CAL27 (plaqueamento inicial de 100x10<sup>4</sup> células) visualizado em microscópio óptico com objetiva de 4X. ....63

Figura 12: Crescimento dos esferoides gerados com micromoldes de agarose (MicroTissues® 3D Petri Dish®) no dia 1, dia 3 e dia 7 de cultivo, com concentrações iniciais de plaqueamento 50x10<sup>4</sup> e 100x10<sup>4</sup> células por molde. Intensity Mean Value: Valor Médio de Intensidade. Barras de escala: 50µm. ....64

Figura 13: Monitoramento do crescimento de esferoides por análise do diâmetro e intensidade de fluorescência usando o método Alamar Blue. A - Diâmetro dos esferoides gerados com o modelo de Placa de Petri 3D MicroTissues®; B - Intensidade de fluorescência dos esferoides gerados com a placa de agarose e o modelo de Placa de Petri 3D MicroTissues®. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Valor de p: (\*\*) p<0.01 (\*\*\*) p<0.001 e (\*\*\*\*) p<0.0001. ....66

Figura 14: Comportamento dos esferoides de carcinoma de células escamosas (CAL27) frente ao tratamento com 22-HTG. A: Imagens representativas dos esferoides tratados com 22-HTG; B: Diâmetro dos esferoides após tratamento com 22-HTG; C: Percentual de inibição do crescimento tumoral dos esferoides tratados com 22-HTG comparado ao controle negativo; D: Porcentagem de viabilidade celular da CAL27 após tratamento de 48 horas com 22-HTG e cisplatina (10 µM). Valor de p: (\*\*\*\*) p<0.0001. Barras de escala: 50 µm. ....70

Figura 15: Imagens representativas de microscopia de fluorescência de esferoides gerados com o modelo MicroTissues® 3D Petri Dish® nas densidades iniciais de células de 50x10<sup>4</sup> e 100x10<sup>4</sup> após 7 dias. A fluorescência verde indica a coloração com Acridine Orange nas células vivas e a fluorescência vermelha indica a coloração com Brometo de Etídio nas células mortas. As imagens foram adquiridas com o software de imagem NIS-Elements 4.30.01 (Nikon Instruments, Melville, NY). As barras de escala representam 50 e 100 µm. ....73

Figura 16: Imagens representativas de microscopia de fluorescência de esferoides gerados com o modelo MicroTissues® 3D tratados com 22-βhidroxitingenona (22HTG) nas concentrações 1,25 e 2,5 µM e Cisplatina na concentração de 10µM após 48 horas de tratamento. As barras de escala representam 100 µm. ....74

Figura 17: Cortes histológicos da pele humana reconstruída com linhagem celular de carcinoma de células escamosas (CCE-Skin) cultivadas no período de 10 dias coradas com Hematoxilina e Eosina. As peles com carcinoma de células escamosas

apresentaram camadas contínuas de células bem marcadas na epiderme e células no tecido conjuntivo da derme. A – Aumento 20x; B – Aumento 100x. .... 78

Figura 18: Peles humanas reconstruídas HaCat *Skin* (A) e CCE *In situ* (B) visualizadas sem o auxílio do microscópio e visualização dos esferoides do modelo CCE *In situ* em microscópio óptico (C), aumento 10X. Barra de escala: 50  $\mu$ m. .... 79

Figura 19: Viabilidade celular das peles humanas reconstruídas *in vitro* não tratadas e tratadas com 22-HTG após 48 horas de tratamento. A: Hacaat-*Skin*; B: CCE-*Skin* e C: CCE-*In Situ*. Valor de p: (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  ..... 81

Figura 20: Atividade de metaloproteinases 2 e 9 em sobrenadante de peles humanas reconstruídas sem célula tumoral (Hacaat-*Skin*) e tumoral com carcinoma de células escamosas (CCE-*Skin*) após 1, 7 e 10 dias de cultivo. .... 83

Figura 21: Zimografia *in situ* em modelo de pele humana reconstruída com esferoides de carcinoma de células escamosas (CCE-*In Situ*) tratados com 22- $\beta$ hidroxitingenona (22-HTG) após 48 horas. A fluorescência na cor verde devido à atividade gelatinolítica foi encontrada na matriz extracelular dos tumores na pele. A: Imagens capturadas com fluorescência. Barra de escalas: 100  $\mu$ m. B: Análise quantitativa da fluorescência na zimografia *in situ*. .... 85

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Lista de substâncias químicas selecionadas para o ensaio de Irritação em modelo HaCat-*Skin* de acordo com os critérios da OECD TG 439 (2015) e ONU (2013). A lista inclui 5 substâncias não irritantes (sem categoria GHS) e 6 substâncias irritantes (categoria 2 GHS), o Tween-20 foi incluído por ser considerado como categoria 3 GHS. .... 42
- Tabela 2: Parâmetros dos protocolos específicos dos métodos validados pelo guia OECD 439 em comparação com os parâmetros definidos do modelo de pele humana reconstruída da HaCat-*Skin*. .... 57
- Tabela 3: Viabilidade celular de fibroblastos humanos (MRC5), queratinócitos humanos (HaCat) e linhagem de carcinoma de células escamosas (CAL27) após tratamento com a 22-HTG de 24, 48 e 72 horas. DOX: Doxorrubicina. .... 69

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo de séculos, os pesquisadores têm se valido da experimentação em animais para aprimorar seus conhecimentos sobre o funcionamento do corpo humano e suas habilidades cirúrgicas. No entanto, a utilização de animais na experimentação, muitas vezes de forma irracional, gerou um aumento considerável na quantidade de animais nos experimentos, trazendo uma crescente necessidade de racionalizar ou até mesmo substituir essa prática (HUBRECHT; CARTER, 2019; RIVERA, 2001; VAN NORMAN, 2019).

Em 1959, os pesquisadores William Russel e Rex Burch lançaram o livro "Principles of Human Experimental Technique", que marcou o início de um movimento em defesa dos animais utilizados em pesquisas e trouxe à tona discussões sobre o uso de animais para avaliação de toxicidade. A partir desse movimento, foi estabelecido o princípio dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição) para o uso de animais. A redução refere-se à obtenção de informações equivalentes utilizando um menor número de animais. O refinamento busca aliviar ou minimizar a dor, o sofrimento ou o estresse dos animais durante os procedimentos. Já a substituição preconiza a realização de determinados objetivos sem o uso de animais vertebrados vivos (HUBRECHT; CARTER, 2019; RUSSELL; BURCH, 1959).

Os métodos alternativos podem ser definidos como qualquer abordagem que substitua, reduza ou aprimore o uso de animais em pesquisas biomédicas, testes ou ensino. Essas alternativas buscam fornecer informações valiosas sem a necessidade de recorrer a animais vivos, contribuindo para a ética na pesquisa científica e o bem-estar animal (BRASIL, 2022a; DOKE; DHAWALE, 2015).

Os modelos de pele utilizando cultura celular tridimensional representam um grande avanço como métodos alternativos ao uso de animais na experimentação (MANUSCRIPT, 2012). Nesse contexto, a utilização de métodos alternativos eficazes para ensaios *in vitro* de segurança são necessários para refinar, reduzir e substituir modelos com animais e melhorar o cenário da pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Tais modelos podem facilitar o estudo dos aspectos mecanicistas dos processos da doença que estão envolvidos na transformação maligna, invasão precoce e crescimento tumoral, além de facilitar a fase final de testes *in vitro* de novos tratamentos, testes diagnósticos e sistemas de administração de fármacos (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; COLLEY et al., 2011; DOKE; DHAWALE, 2015; ZANONI et al., 2019).

O câncer é considerado um grupo de doenças caracterizado pela alteração no padrão de proliferação celular, em que o número de células aumenta além de suas taxas normais, podendo atingir outros tecidos e órgãos, processo conhecido como metástase (OMS, 2020). O câncer é responsável pela morte prematura em 134 de 183 países no mundo, incluindo o Brasil, e as estimativas apontam que em 2040 a incidência atinja a marca de aproximadamente 29,5 milhões de novos casos (FERLAY et al., 2019; OMS, 2020).

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um dos tipos de câncer de pele não melanoma mais prevalentes em todo o mundo e se origina nas células que compõem o tecido epitelial, os queratinócitos (BRENER et al., 2007). As células tumorais se originam em decorrência de alterações nos queratinócitos e o estudo de como ocorrem essas alterações nas funções biológicas da pele, ou mesmo avaliação da presença e magnitude das mesmas, frente a xenobióticos é crítico no desenvolvimento de produtos eficazes para o tratamento do câncer e entendimento

do microambiente tumoral (MAAS-SZABOWSKI; STÄRKER; FUSENIG, 2003; REIJNDERS et al., 2015).

A natureza oferece uma vasta gama de substâncias químicas com estruturas complexas e propriedades únicas. Essa diversidade química pode fornecer compostos com potencial terapêutico para combater o câncer de várias maneiras, seja inibindo o crescimento de células cancerígenas, induzindo a apoptose (morte celular programada) ou inibindo a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos para o tumor). Muitos medicamentos atualmente utilizados no tratamento do câncer têm origem natural ou foram desenvolvidos a partir de compostos naturais. A vincristina e a vimblastina, por exemplo, são alcaloides isolados da planta *Catharanthus roseus* e são amplamente utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer (MAJOLO et al., 2019; PADMAA PAARAKH et al., 2019).

As substâncias naturais muitas vezes contêm uma variedade de compostos ativos que podem agir sinergicamente ou complementarmente no combate ao câncer. A combinação de diferentes substâncias naturais ou sua combinação com terapias convencionais pode levar a abordagens terapêuticas mais eficazes e reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência aos medicamentos. É importante ressaltar que embora as substâncias de origem natural tenham demonstrado potencial no tratamento do câncer, ainda é necessário um rigoroso processo de pesquisa, incluindo estudos não clínicos e clínicos, para avaliar sua eficácia, segurança e mecanismos de ação antes que possam ser amplamente utilizadas como medicamentos (MAJOLO et al., 2019; TRENDOWSKI, 2015).

O tratamento convencional para o carcinoma de células escamosas consiste na combinação de procedimento cirúrgico, radioterapia e quimioterapia (SHIMIZU et al., 2011). No entanto, além de elevado custo econômico, a quimioradioterapia



promove um aumento da toxicidade e a excisão cirúrgica, quando indicada, acarreta muitas vezes em mutilações, que por ser um câncer de alta prevalência se torna um problema de saúde pública (AASI & HONG, 2023; BRAUCHLE et al., 2013; BRENER et al., 2007). Com isso, a busca de novas estratégias para o entendimento e tratamento do carcinoma de células escamosas é uma necessidade constante, sendo os modelos de cultivo celular tridimensional, como as peles humanas reconstruídas, uma das estratégias promissoras (MANUSCRIPT, 2012; SHIMIZU et al., 2011).

Diante do exposto, considerando a necessidade de estudos de aplicação dos modelos de pele humana reconstruída *in vitro* e a constante busca por métodos alternativos ao uso de animais em experimentação validados para compreensão do microambiente tumoral e desenvolvimento do câncer de forma mais fidedigna ao que ocorre *in vivo*, bem como, contribuir com a pesquisa de novos fármacos, com origem natural, para o tratamento do carcinoma de células escamosas, pretende-se estabelecer nesse trabalho um modelo de carcinoma de células escamosas *in vitro* para ser utilizado na pesquisa e desenvolvimento do microambiente tumoral e de produtos promissores com atividade biológica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Métodos alternativos ao uso de animais em experimentação: marcos históricos e aspectos legais

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser definida como a capacidade que ela apresenta de causar dano grave ou morte, mas para que este dano ocorra é indispensável a interação do agente com o organismo (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Para avaliar não só a segurança, mas também a eficácia de novos produtos farmacêuticos, ensaios *in vivo* utilizando animais são indispensáveis para detectar tais desfechos, mas devem ser racionalizados respeitando todos os aspectos éticos da experimentação com animais (CHORILLI; SCARPA, 2007; PFUHLER et al., 2010; VAN NORMAN, 2019).

Os estudos não-clínicos da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos incluem métodos *in vivo* com animais e *in vitro* por meio de testes alternativos validados e aceitos internacionalmente para atestar a segurança do novo medicamento (VAN NORMAN, 2020). Os estudos não-clínicos propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) incluem: estudos de toxicidade de dose-única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade (dano ao DNA), tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (ANVISA, 2013).

O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) é responsável por regular e supervisionar a utilização de animais em atividades de

ensino e pesquisa científica no Brasil. Em 2016, o CONCEA publicou a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica com a finalidade de apresentar os princípios e as condutas que garantam o cuidado e manejo eticamente correto dos animais de experimentação (CONCEA, 2016). Em 2023, publicou o Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, com o intuito trazer orientações e reflexão crítica ao uso de animais na experimentação (BRASIL, 2023).

No Brasil, a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução dos testes alternativos que substituam os animais em atividade de ensino e pesquisa é do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A fim de refinar, reduzir e/ou substituir modelos com animais e melhorar o cenário da pesquisa e desenvolvimento de produtos no Brasil, uma série de métodos alternativos foram e estão sendo desenvolvidos para atividades de ensino e pesquisa (HUBRECHT; CARTER, 2019).

O CONCEA, reconhece mais de 30 métodos alternativos ao uso de animais na experimentação que podem ser utilizados em ensaios de desenvolvimento de produtos no Brasil, incluindo testes para avaliação da irritação e corrosão da pele e ocular, fototoxicidade, absorção cutânea, toxicidade aguda, genotoxicidade (BRASIL, 2014), toxicidade reprodutiva, avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis (BRASIL, 2016, 2019), sensibilização dérmica, avaliação de efeitos estrogênicos, endócrinos e androgênicos, dentre outros (BRASIL, 2022b).

A Resolução Nº 58, de 24 de fevereiro de 2023, do CONCEA, proíbe no Brasil o uso de animais (exceto seres humanos) em pesquisa científica e no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos de higiene pessoal, cosméticos

e perfumes, que já utilizam em suas formulações componentes com segurança e eficácia certificada. Através dessa resolução, a obrigatoriedade pela utilização de métodos alternativos reconhecidos pelos CONCEA é exigida no Brasil, se tornando um importante passo no avanço das pesquisas científicas com este foco (BRASIL, 2023).

Com o intuito de auxiliar e incentivar os pesquisadores e instituições a desenvolverem e validarem os ensaios alternativos, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) estabeleceu a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) através da Portaria Nº 491, de 03 de julho de 2012. A criação da rede tem por objetivo: estimular a implantação dos ensaios alternativos, monitorar periodicamente os laboratórios, promover a qualidade dos testes, incentivar a implementação do sistema de qualidade e das boas práticas de laboratório e contribuir para o desenvolvimento, validação e certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais em experimentação (MCTI, 2012).

Os métodos alternativos reconhecidos são validados por centros internacionais de validação conforme diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico e destinam-se à substituição total, parcial ou redução do uso de animais, sendo a abrangência de cada método respeitada conforme especificações (HUBRECHT; CARTER, 2019; OECD, 2015). De acordo com a Resolução Normativa CONCEA Nº 54/2022, que dispõe sobre o reconhecimento no País de métodos alternativos validados ao uso de animais que tenham por finalidade a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais em atividades de ensino e pesquisa, foi estipulado o prazo de até 5 (cinco) anos para a observância dos referidos métodos reconhecidos pelo CONCEA, a contar da publicação da respectiva Resolução Normativa (BRASIL, 2022a).

Um dos métodos utilizados como alternativa ao uso de animais é a cultura de tecidos, células ou organismos inferiores, estes testes incluem diversos tipos de culturas celulares (pele, tumores, fígado, mama, dentre outros) e são capazes de avaliar citotoxicidade de substâncias, mecanismos de ação celular, genotoxicidade, dentre outros (DOKE; DHAWALE, 2015). Novos métodos vêm surgindo com o intuito de se aproximar mais ainda do que ocorre *in vivo*, um exemplo, é a pele artificial ou equivalente epidérmico/dérmico ou pele humana reconstruída desenvolvida em cultura tridimensional (LOW et al., 2020; OH et al., 2013; PADRÓN et al., 2000; RIVERA, 2001).

## **2.2 Modelos tridimensionais de cultura celular**

*In vivo*, as células que compõem os tecidos e órgãos desenvolvem-se e multiplicam-se em uma estrutura tridimensional e para mimetizar esse ambiente na experimentação, as células são cultivadas em arcabouços *in vitro* contendo uma matriz extracelular de desenvolvimento, como de hidrogel, matrigel, colágeno tipo I, esferas, explantes organotípicos, dentre outros modelos, que permitem uma análise celular tridimensional (GODUGU et al., 2013; HENSLER et al., 2019; LIM et al., 2011; PAGEON et al., 2014).

As culturas em monocamada ou bidimensional apresentam estruturas de sinalização e adesão que podem representar estágios exagerados de situações dinâmicas *in vivo*, uma vez que não conseguem refletir o complexo comportamento celular com a matriz extracelular em ambiente tridimensional, como os modelos 3D de cultivo celular (BATTISTA et al., 2005; PAGE; FLOOD; REYNAUD, 2013). Consequentemente, as células podem reagir de forma diferente a perturbações

externas quando esse modelo é usado como uma ferramenta para testar respostas de fármacos ou uma função biológica (BAGHBAN et al., 2020; NIERO et al., 2014).

O desenvolvimento de modelos de pele humana reconstruída *in vitro* torna-se um importante meio para mimetizar o microambiente de tecidos vivos em um ambiente tridimensional. Esses modelos de pele *in vitro* são criados usando técnicas de engenharia de tecidos, nas quais células humanas são cultivadas em estruturas que imitam a arquitetura e as propriedades da pele natural. Desde 1970, diversos modelos vêm surgindo com uma variedade de aplicações (DESHMUKH et al., 2012; KOJIMA et al., 2014; LOW et al., 2020; MACNEIL, 2007; OECD, 2000).

Os modelos de pele *in vitro* têm várias aplicações na pesquisa científica e no desenvolvimento de produtos. Eles podem ser usados para estudar processos de cicatrização de feridas, toxicologia cutânea, desenvolvimento de medicamentos dermatológicos, testes de cosméticos e avaliação de produtos de cuidados com a pele, além de permitir uma alternativa ética aos testes em animais (ABDEL-NASER et al., 2005; FILAIRE et al., 2022; RIVERA, 2001; ROGUETE et al., 2000).

A aplicação de peles humanas reconstruídas é muito diversificada e envolve a área farmacêutica, química, cosmética, toxicológica, dentre outras. O Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos aos Testes em Animais (*European Centre for the Validation of Alternative Methods to Animal Testing - ECV AM*) aprovou os modelos de pele humana reconstruída como cientificamente válidos e são aceitos para prever corrosão da pele, irritação e permeação cutânea. Estudos promissores vem sendo realizados para prever genotoxicidade, sensibilização cutânea e fototoxicidade da pele experimental a substâncias (DAHL et al., 2011; KOJIMA et al., 2014; WEVER et al., 2015).

Além disso, os modelos de pele reconstruída *in vitro* também podem incorporar diferentes tipos de células encontradas na pele, como queratinócitos (células epiteliais), fibroblastos (células produtoras de colágeno) e células imunológicas, para reproduzir de forma mais precisa a complexidade da pele natural (GABBOTT; SUN, 2018; GANGATIRKAR et al., 2007; MAAS-SZABOWSKI; STÄRKER; FUSENIG, 2003; MARTIN; VULIN; HENDRY, 2016).

No entanto, é importante destacar que, embora os modelos de pele humana reconstruída *in vitro* possam fornecer informações valiosas, eles ainda não conseguem reproduzir completamente a complexidade e a funcionalidade da pele humana. A pesquisa contínua nessa área é necessária para aprimorar esses modelos e torná-los cada vez mais semelhantes à pele natural (BOELSMA et al., 2000; CANDI; SCHMIDT; MELINO, 2005; HENSLER et al., 2019; NATH; DEVI, 2016).

Entre os métodos alternativos *in vitro* validados propostos recentemente, aqueles que usam pele humana reconstruída constituem uma abordagem promissora para esses tipos de ensaios, uma vez que, além de mimetizar o local da aplicação do produto, permitem a aplicação tópica e a avaliação de algumas reações clínicas. O uso de pele humana reconstruída, permite a aplicação tópica de substâncias com problemas de solubilidade e estabilidade química em solução aquosa, umas das principais limitações de muitos métodos *in vitro* baseados na utilização de culturas submersas (GIBBS et al., 2013; REIJNDERS et al., 2015; ROQUETE et al., 2000).

Os modelos de pele utilizando cultura celular tridimensional já são reconhecidos internacionalmente para ensaios *in vitro* e representam um grande avanço como métodos alternativos ao uso de animais na experimentação (OECD, 2015). Este método envolve a cultura de queratinócitos numa interface ar-líquido em uma matriz de colágeno tipo I contendo fibroblastos. As interações entre o mesênquima e o

epitélio são essenciais para o desenvolvimento e manutenção normal do epitélio. Portanto, não é surpreendente que o microambiente estromal seja conhecido por desempenhar um papel significativo na invasão e progressão tumoral (ANDERSON; SIMON, 2020; MARSH et al., 2011; MUELLER; FUSENIG, 2004).

Nesse contexto, a utilização de métodos alternativos eficazes para ensaios *in vitro* de segurança são necessários para refinar, reduzir e substituir modelos com animais e melhorar o cenário da pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Tais modelos podem facilitar o estudo dos aspectos mecanicistas dos processos da doença que estão envolvidos na transformação maligna, invasão precoce e crescimento tumoral, além de facilitar a fase final de testes *in vitro* de novos tratamentos, testes diagnósticos e sistemas de administração de fármacos (BALASUBRAMANI; KUMAR; BABU, 2001; COLLEY et al., 2011; LOW et al., 2020; NIEHUES et al., 2018).

### **2.3 Carcinoma de células escamosas e métodos alternativos ao uso de animais na experimentação**

O câncer se desenvolve a partir de alterações nas células normais que adquirem uma sucessão de características responsáveis pela modificação da via de sinalização celular para proliferação, inativação de genes supressores de tumor, escape da defesa imunológica, instabilidade genômica e mutação, desregulação do metabolismo, dentre outras modificações que as tornam neoplásicas e malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2011; NEHAL; BICHAKJIAN, 2018).

Quando as alterações para a tumorigênese são originadas de queratinócitos epiteliais, dois subtipos de câncer podem ser identificados: o carcinoma de células



basais e o carcinoma de células escamosas (YANOFSKY; MERCER; PHELPS, 2011). Ambos são tradicionalmente referidos como câncer de pele não melanoma, mas esse termo é mais abrangente, pois engloba outros tipos de cânceres que não estão correlacionados especificamente com queratinócitos, como carcinoma de células de Merkel, carcinoma Anexial, dermatofibrossarcoma protuberante (KARIMKHANI et al., 2015; NEHAL; BICHAKJIAN, 2018).

O carcinoma de células escamosas se diferencia do carcinoma de células basais quanto a localização de origem epitelial, uma vez que se origina nas células escamosas, que são células planas e finas que compõem a epiderme da pele. Também pode se desenvolver em outras áreas onde as células escamosas estão presentes, como na mucosa oral, esôfago, pulmões e genitais. O carcinoma de células basais se origina nas células basais da epiderme da pele, que são células localizadas na camada mais profunda da epiderme. Esse tipo de câncer é mais comumente encontrado na pele exposta ao sol, como o rosto, o pescoço e as orelhas (DONOVAN, 2009; OWENS; WATT, 2003).

O carcinoma de células escamosas é o segundo tipo de câncer de pele não melanoma mais comum no mundo, representando 20% de todos os cânceres de pele (QUE; ZWALD; SCHMULTS, 2018). Como acomete os queratinócitos da epiderme, podem ocorrer em todas as partes do corpo, incluindo mucosas e genitais, embora se desenvolvam mais nas áreas que são expostas ao sol, como rosto, couro cabeludo, pescoço, braços, pernas (CHAMOLI et al., 2021; NEHAL; BICHAKJIAN, 2018; WALDMAN; SCHMULTS, 2019).

Em 2020, as estimativas do *Global Cancer Observatory* (Globocan), elaboradas pela *International Agency for Research on Cancer* (Iarc) apontam que ocorreram 19,3 milhões de casos novos de câncer e 18,1 milhões de câncer de pele não melanoma.

Indicando que um em cada cinco indivíduos terão câncer durante sua vida (FERLAY et al., 2019; SUNG et al., 2021). No Brasil, as estimativas apontam 101.920 mil casos de câncer de pele não melanoma em homens e 118.570 mil casos em mulheres em 2023, sendo as regiões sul, centro-oeste e sudeste mais incidentes para homens, seguido das regiões nordeste e norte (Figura 01). Para as mulheres, o câncer de pele não melanoma é o mais incidente em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2022c).

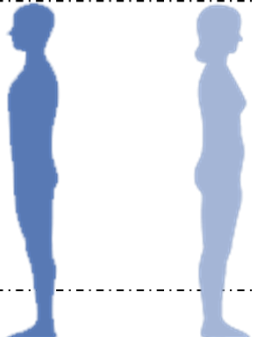
Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Pele não melanoma	101.920	29,86			Pele não melanoma	118.570	16,84
Próstata	71.730	21,01			Mama feminina	73.610	10,45
Cólon e Reto	21.970	6,44			Cólon e Reto	23.660	3,36
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.020	5,28			Colo do útero	17.010	2,42
<b>TOTAL DE NEOPLASIAS</b>	<b>341.350</b>				<b>TOTAL DE NEOPLASIAS</b>	<b>704.080</b>	

Figura 1 - Distribuição proporcional dos principais tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por gênero para o Brasil. Adaptada de:(BRASIL, 2022c)

Os fatores de risco mais significantes para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas incluem a exposição ao sol, idade acima de 60 anos, pele clara e imunossupressão (QUE; ZWALD; SCHMULTS, 2018; WALDMAN; SCHMULTS, 2019). Apesar de ser mais comum em pessoas de pele clara, também acomete pacientes negros, mas devido ao diagnóstico tardio e a ocorrência de carcinoma de células escamosas em locais de trauma anterior ou cicatriz, carrega um pior prognóstico e taxa de mortalidade de 18% nesses pacientes (JACKSON, 2010).

Clinicamente os carcinomas de células escamosas são frequentemente lesões superficiais, discretas com base endurecida, margens arredondadas e elevadas, com

alterações típicas de descamação, ulceração profunda e crostas (ALAM; RATNER, 2001). A queratose actínica é o principal precursor do carcinoma de células escamosas, tipicamente de 2 a 6 mm de diâmetro, mais facilmente detectadas, podendo ser da mesma cor da pele, rosa ou marrom. As taxas de progressão para carcinoma de células escamosas variam de 0,025% a 20%, dependendo do número de lesões e o tempo (GLOGAU, 2000; WALDMAN; SCHMULTS, 2019).

O diagnóstico do carcinoma de células escamosas é feito por biópsia da lesão de pele profunda para permitir a análise da profundidade da lesão e identificar invasão, diferenciação e comunicação com a camada epidérmica (ALAM et al., 2018). Os achados histopatológicos e clínicos recomendados para serem reportados incluem localização e diâmetro do tumor, diminuição da diferenciação celular, presença de subtipos histológicos agressivos, mensuração da invasão em milímetros com classificação do nível de invasão, presença de invasão perineural, avaliação das características de alto risco e o estágio TMN (tumor, nódulo e metástase), além da presença de inflamação, filamentos infiltrativos, células únicas ou pequenos conjuntos de tumores (ALAM et al., 2018; ALAM; RATNER, 2001; WESTERS-ATTEMA et al., 2015; YANOFSKY; MERCER; PHELPS, 2011).

O tratamento do carcinoma de células escamosas só é realizado mediante comprovação da presença de fatores de risco e alterações clínicas e histopatológicas evidentes, sendo a excisão cirúrgica o mais recomendado (KEOHANE et al., 2021; NEHAL; BICHAKJIAN, 2018). Para os pacientes que não têm indicação para cirurgia, a terapia tópica com imiquimod e fluorouracil é uma alternativa e a radioterapia pode ser utilizada como terapia primária ou adjuvante da excisão cirúrgica. Em pacientes com carcinoma metastático, cetuximab associado com antineoplásicos contendo

platina têm sido alternativas para quimioterapia reconhecida internacionalmente (ALAM et al., 2018; MIGDEN et al., 2018).

Como é um dos cânceres mais frequentes no Brasil e no mundo, embora tenha uma baixa letalidade, o grande número de casos e possíveis mutilações em decorrência da excisão cirúrgica o tornam um problema importante de saúde pública no país, o que reforça a necessidade de novos estudos que avaliem de forma mais fidedigna o microambiente tumoral e sua progressão (BRAUCHLE et al., 2013; INCA, 2020; LIM et al., 2011; OMS, 2020).

O desenvolvimento de novas terapias que possam driblar as adversidades do microambiente tumoral é um desafio para as pesquisas e, apesar do número de candidatos a agentes antitumorais crescendo a cada ano, o desenvolvimento de modelos *in vitro*, representativos de um microambiente tumoral, não acompanha este crescimento, impedindo ou retardando o processo de triagem de testes para novos fármacos (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; ZANONI et al., 2019).

Atualmente, os modelos *in vitro* utilizados para estudar o microambiente tumoral geralmente apresentam limitações. As culturas de células de câncer em monocamadas simples ou em culturas 3D com uma única linhagem celular não conseguem recapitular totalmente a complexidade do ambiente tumoral *in vivo* (LOW et al., 2020; VAN NORMAN, 2020; YU et al., 2019).

No entanto, pesquisadores estão trabalhando para desenvolver modelos *in vitro* mais representativos do microambiente tumoral. Uma abordagem promissora é o uso de co-culturas, nas quais diferentes tipos de células tumorais e células estromais são cultivadas juntas para criar um ambiente mais próximo da realidade. Além disso, a incorporação de componentes da matriz extracelular e a utilização de sistemas de

órgãos em chip também estão sendo exploradas para melhorar a representatividade dos modelos *in vitro* (LOW et al., 2020; NIEHUES et al., 2018).

Esses avanços na modelagem do microambiente tumoral *in vitro* têm o potencial de acelerar o processo de triagem de fármacos, permitindo testes mais rápidos e eficientes de novos candidatos a agentes antitumorais. No entanto, é um campo complexo e desafiador, e ainda há muito trabalho a ser feito para desenvolver modelos *in vitro* que sejam verdadeiramente representativos do microambiente tumoral humano e possam prever com precisão a eficácia de novas terapias (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; YU et al., 2019).

#### **2.4 Pesquisa de novos fármacos a partir de fontes naturais**

A pesquisa de novos fármacos a partir de fontes naturais tem sido uma área de grande interesse para muitos pesquisadores ao longo dos anos. Embora seja verdade que nem todos os compostos naturais possam ser diretamente utilizados como novas drogas, eles ainda desempenham um papel crucial na descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Os produtos naturais são substâncias químicas encontradas em organismos vivos, como plantas, animais e microrganismos. Ao longo dos anos têm contribuído com uma longa história de uso na medicina tradicional, sendo utilizados para tratar uma variedade de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2020; SHEN, 2015).

Uma das principais razões pelas quais as pesquisas se concentram em produtos naturais é a sua grande diversidade química. A natureza produz uma ampla gama de compostos bioativos, muitos dos quais possuem propriedades medicinais.

Esses compostos podem ter estruturas complexas e únicas, o que os torna uma fonte valiosa de moléculas para a descoberta de medicamentos. Além disso, os produtos naturais frequentemente exibem uma ampla gama de atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticâncer, anti-inflamatória e muitas outras. Essas atividades biológicas tornam os produtos naturais alvos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que podem ter efeitos terapêuticos específicos e mecanismos de ação únicos (BERNARDINI et al., 2018; SHEN, 2015).

É importante ressaltar que nem todos os compostos naturais são adequados para se tornarem medicamentos diretamente. Alguns podem apresentar desafios, como baixa solubilidade, toxicidade ou instabilidade, que precisam ser superados para desenvolver uma forma farmacêutica adequada. No entanto, mesmo que um composto natural não seja adequado como uma droga em sua forma original, ele ainda pode servir como um ponto de partida valioso para a síntese de análogos ou para o desenvolvimento de compostos derivados mais potentes e seguros (NEWMAN; CRAGG, 2020; PODURI, 2021).

A cisplatina é um exemplo de um fármaco amplamente utilizado que é derivado de um produto natural. Ela é um agente quimioterápico utilizado no tratamento do câncer, especialmente no tratamento de tumores sólidos, como os cânceres de testículo, ovário, bexiga e pulmão. Foi originalmente isolada a partir do mineral complexo chamado cooperita, que é composto principalmente por sulfetos de platina. A descoberta da atividade anticancerígena da cisplatina foi feita acidentalmente na década de 60, em 1965, quando cientistas observaram que o composto inibia o crescimento de células de câncer em cultura (ALDOSSARY, 2019; FUERTES et al., 2003; LOEHRER, 1984).

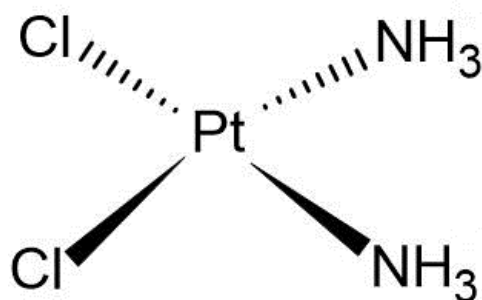


Figura 2 – Estrutura química da cisplatina.

A cisplatina é um agente de ligação ao DNA que forma ligações covalentes entre as cadeias de DNA dentro das células cancerígenas, especialmente com as bases de adenina (A) e guanina (G), impedindo sua replicação e levando à morte celular. Seu mecanismo de ação baseia-se na capacidade de interferir no processo de divisão celular e, assim, inibir o crescimento e a disseminação do câncer. A formação de ligações covalentes entre a cisplatina e o DNA impede que as duas fitas de DNA se separem adequadamente durante a replicação celular, que é um processo necessário para a divisão celular. Isso cria estruturas de DNA anormais conhecidas como adutos de cisplatina, que ativam uma série de vias de sinalização celular que levam à ativação de proteínas envolvidas na resposta ao dano ao DNA. A ativação dessas vias de sinalização leva a uma parada no ciclo celular e à indução da morte celular programada, conhecida como apoptose. As células tumorais danificadas pela cisplatina não podem mais se dividir e se reproduzir, o que limita o crescimento do tumor (ALDOSSARY, 2019; LOEHRER, 1984).

Embora a cisplatina seja um fármaco eficaz, seu uso está associado a efeitos colaterais significativos, como nefrotoxicidade (toxicidade renal), ototoxicidade (toxicidade auditiva) e neurotoxicidade. Portanto, pesquisadores têm se dedicado a buscar novos compostos derivados de produtos naturais ou sintéticos que possam

apresentar atividade anticancerígena sem esses efeitos colaterais indesejados (ALDOSSARY, 2019; FUERTES et al., 2003).

O gênero *Salacia* possui uma importância significativa tanto do ponto de vista químico quanto biológico, pois é considerado uma fonte de compostos ativos com ação em diferentes processos patológicos humanos. Muitos dos efeitos biológicos já identificados para espécies de *Salacia* estão relacionados à presença de triterpenos quinonametídeo. Entre os triterpenos quinonametídeo presentes em *Salacia*, destacam-se aqueles com atividade antidiabética, antioxidante (SAHAYAM; BRINDHA P; LOGAMANIAN M, 2014; STOHS; RAY, 2015). Além disso, também foi identificada a atividade citotóxica contra células tumorais (ARANHA, 2020; ARANHA et al., 2020, 2021; MUSINI; RAO; GIRI, 2015; RODRIGUES et al., 2019)

Esses achados evidenciam o potencial terapêutico dos compostos encontrados em espécies de *Salacia* e estimulam a investigação e o desenvolvimento de novos medicamentos baseados nesses compostos. A atividade citotóxica contra células tumorais também abre caminho para a investigação de possíveis aplicações no desenvolvimento de terapias contra o câncer (DA SILVA et al., 2016; MUSINI; RAO; GIRI, 2015; RODRIGUES et al., 2019).

Estudos relatam a atividade citotóxica do extrato e da fração de *S. impressifolia* contra diferentes linhagens celulares (RODRIGUES et al., 2019). Os pesquisadores demonstraram o potencial anticâncer *in vitro* e *in vivo* e observaram a presença de triterpenoides quinonametídeos, especialmente os compostos tingenona e 22 $\beta$ -hidroxitingenona (22-HTG). A 22-HTG (Figura 2) é um triterpeno quinonemetideo isolado da *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith (DA SILVA et al., 2016) encontrada na região amazônica com atividade citotóxica frente a vários tipos de células de



câncer, incluindo leucemia e melanoma, reduzindo a proliferação celular, migração e invasão (ARANHA et al., 2020, 2021; RODRIGUES et al., 2021).

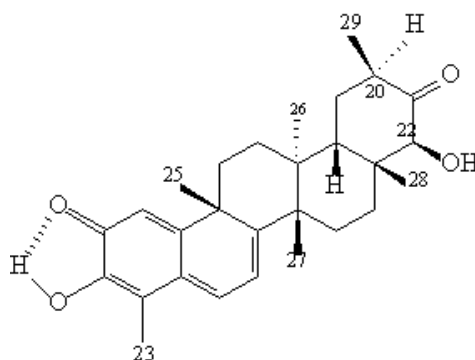


Figura 3 – Estrutura química da 22β-hidroxitingenona.

## 2.5 Microambiente tumoral

O microambiente tumoral é constituído de células tumorais em proliferação que se desenvolvem no tecido, juntamente com estroma tumoral, vasos sanguíneos, células inflamatórias infiltrantes e uma variedade de moléculas e células associadas (Figura 2). Esse ambiente é único, pois surge em curso com a progressão do tumor e a interação com o hospedeiro, sendo moldado e dominado pelo tumor uma vez que coordena os eventos moleculares e celulares que ocorrem nesse ambiente (BAGHBAN et al., 2020; HANAHAN; WEINBERG, 2011; MAMAN; WITZ, 2018; WHITESIDE, 2008).

Como mostrado na figura 4, o epitélio normal da pele é constituído principalmente de queratinócitos bem diferenciados compondo as camadas da epiderme, membrana basal e o compartimento dérmico (estroma). Durante a transição para displasia pré-maligna, a diferenciação das células epidérmicas é perturbada resultando em um epitélio hiperplásico e a progressão para um carcinoma resulta em

aumento da proliferação celular juntamente com um estroma tumoral ativado. Com a progressão do tumor, ele deixa de ser localizado (carcinoma *in situ*) e as células tendem a se infiltrar nos tecidos e atingir os vasos sanguíneos originando a metástase (MUELLER; FUSENIG, 2004; NEHAL; BICHAKJIAN, 2018)

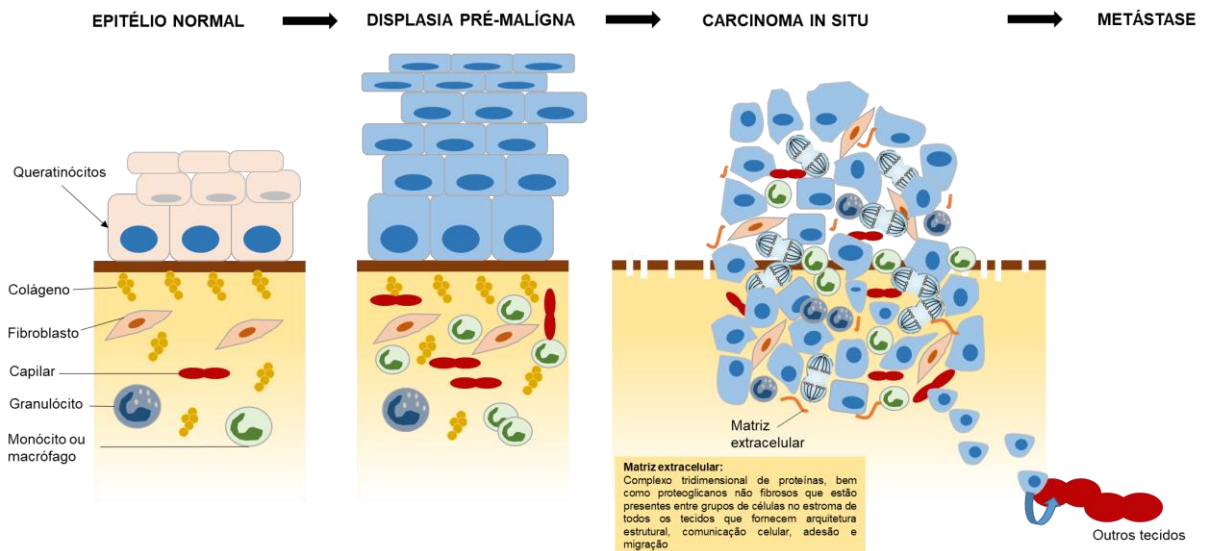


Figura 4 - Estágios de desenvolvimento tumoral e sua correlação com o microambiente tumoral. Durante a transição para displasia pré-maligna o epitélio torna-se hiperplásico e a progressão para um carcinoma resulta em aumento da proliferação celular juntamente com um estroma tumoral ativado, os componentes da matriz são degradados, fibroblastos se diferenciam resultando na expressão de fatores de crescimento, componentes da matriz e proteases degradantes. Com a progressão do tumor, as células tendem a se infiltrar nos tecidos originando a metástase. Adaptado de: (MUELLER; FUSENIG, 2004).

Os fibroblastos e a matriz celular formam o arcabouço que sustenta a expansão do tumoral e contribuem para o estabelecimento da resposta inflamatória que nutre o tumor e promove o crescimento, isquemia, resposta de defesa e aumento do suprimento sanguíneo são alterações do microambiente que influenciam diretamente na progressão do tumor (GREEN; YAMADA, 2007; MAMAN; WITZ, 2018; WONG; MCGRATH; NAVSARIA, 2007). O escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro também auxilia na progressão do tumor, uma vez que as células tumorais conseguem

regular negativamente ou suprimir a imunidade inata e adaptativa (ALLER et al., 2004; MAMAN; WITZ, 2018; WHITESIDE, 2008).

Os fibroblastos constituem o estroma tumoral e sua associação com o câncer envolve funções pró-malignas, fatores de crescimento, proteases e proteínas da matriz extracelular são seletivamente expressadas e secretadas por essas células a fim de auxiliar na progressão de células tumorais adjacentes (GREEN; YAMADA, 2007; MAMAN; WITZ, 2018; WITTE; JOHN, 2005).

As células tumorais formam um microambiente totalmente interligado com o tecido e capaz de dar suporte ao crescimento do tumor, produzindo fatores de crescimento moduladores do estroma, como fator de crescimento de fibroblastos (do inglês *Fibroblast Growth Fator*, FGF), membros da família do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Fator*, VEGF), ligantes do receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês *epidermal growth factor receptor*, EGFR), interleucinas, fatores estimuladores de colônia, fator de crescimento transformador  $\beta$  (do inglês *Transforming Growth Factor- $\beta$* , TGF $\beta$ ) e outros (MAAS-SZABOWSKI; STÄRKER; FUSENIG, 2003; MUELLER; FUSENIG, 2004; TOWNSEND et al., 2017).

Compreender a interação das células tumorais com o microambiente em que elas se desenvolvem pode ser usado para estudar estratégias terapêuticas eficazes para prever e neutralizar táticas de sobrevivência e progressão implantadas pelas células tumorais (BAGHBAN et al., 2020). Com isso, a utilização de modelos que mimetizem o microambiente tumoral pode poupar tempo e custos ao passo que conseguem obter respostas biológicas da progressão tumoral de forma mais fidedigna ao considerar a influência do microambiente tumoral no desenvolvimento do câncer (GREEN; YAMADA, 2007; MUELLER; FUSENIG, 2004).

Recentemente, o grupo de pesquisa do Laboratório de Atividade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, desenvolveu e padronizou um modelo de pele humana reconstruída totalmente com linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos humanos, o que gerou uma dissertação de mestrado (SOUSA, 2018) e um depósito de patente sob o número BR 10 2019 017285 1. Esse modelo apresentou função barreira e características morfológicas semelhantes às peles reconhecidas e validadas pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD da sigla em inglês), que estimula o desenvolvimento de novos métodos alternativos ao uso de animais em experimentação.

Considerando o modelo desenvolvido de pele humana reconstruída *in vitro*, bem como, a necessidade de ensaios que comprovem sua aplicabilidade para estudos de pesquisa e desenvolvimento de substâncias com potencial biológico, atrelada a busca constante de métodos alternativos para estudo do microambiente tumoral, esse trabalho tem como objetivo estabelecer um modelo de carcinoma de células escamosas que possa ser utilizado para o estudo desse tipo de câncer e, ao mesmo tempo, fornecer resultados sobre a aplicabilidade da pele desenvolvida no laboratório para pesquisas futuras.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um modelo *in vitro* de carcinoma *in situ* com células escamosas para o estudo do microambiente tumoral.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer modelo de carcinoma de células escamosas em pele humana equivalente *in vitro*;
- Avaliar morfologicamente equivalentes de pele humana sem célula tumoral (HaCat-Skin), com carcinoma de células escamosas (CCE-Skin) e com esferoides de carcinoma de células escamosas (CCE *In situ*-Skin);
- Avaliar a aplicabilidade do modelo de pele HaCat-Skin para ensaios de irritação e permeação cutânea;
- Investigar o efeito de substâncias citotóxicas sobre as células tumorais no microambiente tridimensional de carcinoma de células escamosas *in vitro*;
- Testar a aplicabilidade do modelo de pele com carcinoma de células escamosas CCE *In situ* para ensaios de invasão tumoral;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Cultura celular

Foram utilizadas linhagens celulares de fibroblasto humano (MRC5), queratinócitos humanos (HaCat) e carcinoma de células escamosas de língua (CAL27) cultivadas em pele humana reconstruída aqui denominada CCE-Skin. O modelo de pele sem carcinoma de células escamosas denominado HaCat-Skin, foi utilizado como controle comparativo e o modelo CCE *insitu*-Skin foi desenvolvido a partir de esferoides de CAL27 (Figura 5).

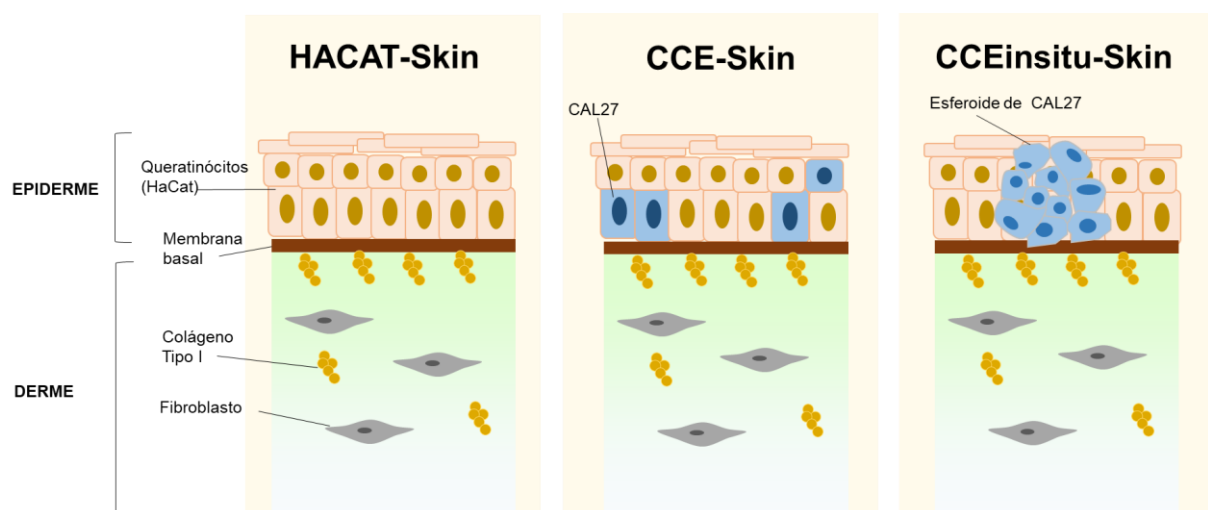


Figura 5 - Representação dos modelos de pele normal (HaCat-Skin), com carcinoma de células escamosas (CCE-Skin) e com esferoide de carcinoma de células escamosas *in situ* (CCE *Insitu*-Skin). Fonte: A autora.

Todas as linhagens utilizadas foram cultivadas no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. As linhagens de HaCat e MRC5 foram gentilmente cedidas pela professora Silvyta Stuchi Maria-Engler e a linhagem de CAL27 foi gentilmente cedida

pela professora Vanessa Morais Freitas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina, mantidas em incubadora com atmosfera umidificada a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub>. A observação do crescimento celular foi feita utilizando um microscópio óptico invertido (Zeiss) a cada 24 horas.

Para a manutenção dos tecidos, o meio de cultivo utilizado foi preparado de acordo com (BROHEM et al., 2011; MAAS-SZABOWSKI; STÄRKER; FUSENIG, 2003) com modificações, contendo o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e mistura comercial de nutrientes HAM-F12, acrescido de Toxina colérica (1 µM), Insulina (5 mg/mL), Apo-transferrina (5 mg/mL), Hidrocortisona-21 (0,1 mg/mL), Epidermal Growth Factor (2 µg/mL) e Transforming growth factor-α (TGF-α, 100 µg/mL).

#### **4.2 Geração das peles humanas reconstruídas *in vitro***

A montagem da HaCat-Skin foi realizada de acordo com Sousa (2018), registrada sob patente BR 10 2019 017285-1 (Anexo 01), com modificações. Para reconstrução da derme os fibroblastos MRC5 (25x10<sup>4</sup> células) foram adicionados a uma mistura de colágeno tipo I GIBCO (3 mg/mL A1048301 – Thermo Fisher Scientific, 700 µL), Soro Fetal Bovino (50 µL), tampão de reconstituição 10X (NaOH 0,05 M, NaHCO<sub>3</sub> 2,2%, HEPES 200 mM – 108 µL) e mistura de nutrientes HAM-F12 10X (108 µL) por pele. Em seguida, 800 µL dessa mistura foi transferida para uma placa de 12

poços contendo insertos de 12 mm de diâmetro e 1,12 cm<sup>2</sup> de área, com membrana de 0,4 µm (Corning transwell®).

Após o processo de gelificação do colágeno em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos e estabilização do pH com PBS, os queratinócitos (50x10<sup>4</sup> células) foram plaqueados sobre a derme para reconstrução da epiderme. Para o modelo CCE-Skin, 15x10<sup>4</sup> células foram plaqueadas juntamente com os queratinócitos. As células foram mantidas por 24 horas submersas em meio de cultivo suplementado, como descrito anteriormente, para adesão sobre a derme. Em seguida, o meio de cultivo foi retirado do interior do inserto para permitir a interface ar-líquido. As peles foram mantidas por 10 dias em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub> para diferenciação e crescimento dos queratinócitos da epiderme e a troca de meio da parte externa ao inserto feita a cada dois dias.

### **4.3 Ensaio de irritação cutânea *in vitro***

Afim de avaliar a aplicabilidade do modelo de HaCat Skin desenvolvido para a ensaios de irritação cutânea *in vitro*, utilizou-se um protocolo semelhante ao utilizado para o modelo EpiSkin™ (OECD 439), com algumas modificações. Para isso, após um período de pré-incubação de 2 horas, os tecidos foram removidos da incubadora e imediatamente expostos a substâncias irritantes e não irritantes. Quando as substâncias eram líquidas, foram aplicados 30 µL sobre a superfície do tecido; quando sólidas, foram aplicados 30 µg, precedidos por 30 µL de PBS aplicado diretamente no inserto. Como controle positivo, utilizou-se SDS a 5% em PBS.



Após uma exposição de 15 minutos às substâncias testadas, os tecidos foram lavados com PBS e mantidos na incubadora por mais 42 horas. Após esse período, os tecidos foram transferidos para placas de 24 poços e incubados com MTT (1 mg/mL) por 3 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os tecidos foram novamente lavados com PBS e transferidos para uma nova placa contendo 2 mL de isopropanol para a extração do formazan reduzido. Essa placa foi mantida em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, coletou-se 200 µL da solução de extração e transferiu-se para uma placa de 96 poços. A densidade óptica do corante púrpura resultante foi medida a 570 nm utilizando um leitor de placas de ELISA (OECD TG 439, 2015).

As substâncias testadas no ensaio de irritação foram selecionadas de acordo com a os critérios da OECD (TG 439) e do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS por sua sigla em inglês) da Organização das Nações Unidas (ONU), que estabelece critérios harmonizados para classificar substâncias e compostos com relação aos perigos físicos, para a saúde e para o meio ambiente (ONU, 2013). As informações das substâncias selecionadas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Lista de substâncias químicas selecionadas para o ensaio de Irritação em modelo HaCat-Skin de acordo com os critérios da OECD TG 439 (2015) e ONU (2013). A lista inclui 5 substâncias não irritantes (sem categoria GHS) e 6 substâncias irritantes (categoria 2 GHS), o Tween-20 foi incluído por ser considerado como categoria 3 GHS.

<b>Substância</b>	<b>CAS NR</b>	<b>Estado Físico</b>	<b>Categoria segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS por sua sigla em inglês) das Nações Unidas (ONU)</b>
Álcool cetoestearílico	36653-82-4 e 112-92-5 (30/70)	Sólido	Sem categoria
Bicarbonato de Sódio	144-55-8	Sólido	Sem categoria
Glicerol	56-81-5	Líquido	Sem categoria
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Sem categoria
Propilenoglicol	57-55-6	Líquido	Sem categoria
Ácido Salicílico	69-72-7	Sólido	Toxicidade aguda, Oral (Categoria 4), H302 Lesões oculares graves (Categoria 1), H318 Toxicidade à reprodução (Categoria 2), H361
Ácido Cítrico	77-92-9	Sólido	Irritação ocular (Categoria 2A), H319 Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única (Categoria 3), Sistema respiratório, H335
Ácido Láctico	50-21-5	Líquido	Toxicidade aguda, Oral (Categoria 5), H303 Irritação da pele (Categoria 2), H315 Lesões oculares graves (Categoria 1), H318
C19 – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno	937-14-4	Sólido	Peróxidos orgânicos (Tipo D), H242 Irritação da pele (Categoria 2), H315 Irritação ocular (Categoria 2A), H319 Sensibilização à pele. (Categoria 1), H317 Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única (Categoria 3), Sistema respiratório, H335
Hidróxido de Potássio (5% Aquoso)	1310-58-3	Líquido	Toxicidade aguda, Oral (Categoria 3) Irritação cutânea (Categoria 2) Irritação ocular (Categoria 2A) Toxicidade aguda para o ambiente aquático (Categoria 3)
Tween 20	9005-64-5	Líquido	Irritação cutânea (Categoria 3), H316

#### 4.4 Ensaio de permeação cutânea *in vitro*

O procedimento *in vitro* para o estudo de permeação cutânea foi realizado conforme descrito no guia da (OECD TG 428, 2004; SCHÄFER-KORTING et al., 2006). Neste ensaio, a substância avaliada é aplicada sobre a pele e sua difusão ocorre por gradiente de concentração para uma solução receptora onde será realizada a determinação analítica do conteúdo de substância permeada ao longo do tempo.

Para estudos de permeação cutânea, a OCDE propõe o uso de cafeína (logP = 0.01; Peso molecular = 194;) dentre as substâncias de referência com baixa lipofilicidade. A solução estoque foi preparada da seguinte forma: cafeína 0,1% (m/v) diluída em PBS estéril. A solução estoque foi armazenada por pelo menos quatro semanas a 4 °C.

Para realização do ensaio de permeação, 50 µL de cafeína na concentração 500 µg/mL diluída em PBS estéril foi adicionada sobre a pele. Considerando a área do inserto e da pele 1,12 cm<sup>2</sup>, a cafeína foi adicionada na concentração de 22,32 µg/cm<sup>2</sup>. A câmara de difusão e a pele foram mantidas a uma temperatura constante próxima à temperatura normal da pele, de 32 ± 1°C. As dosagens foram feitas no meio receptor coletado (1 mL) após 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 minutos de exposição utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High performance Liquid Chromatography* – HPLC).

A coluna de HPLC utilizada (XTerra MSC18; 50 × 2.1mm i.d. 5µm; Waters) foi mantida a 40 °C. A fase móvel consistiu de um tampão de fosfato a 10 mM, ajustado para pH 3,5 com ácido o-fosfórico; o modificador orgânico acetonitrila (MeCN). A cromatografia foi realizada usando um gradiente (5-95% de MeCN de 0-5 min, 5% de

MeCN de 5,1-7 min). A taxa de fluxo foi ajustada para 0,6 mL/minuto, e 10 uL da solução foi injetada.

O percentual da dose de cafeína no fluido receptor foi calculado com base na área total do pico da solução padrão na concentração 500 µg/mL que correspondeu a 100%. A seguinte fórmula foi utilizada para determinação do percentual da dose de cafeína no fluido receptor:

Percentual de dose no fluido receptor = (Área do pico da cafeína / Área total do pico da solução padrão)\* 100

O percentual total de cafeína presente no fluido receptor foi calculado com base na somatória das áreas dos picos dos cromatogramas, obtidos nos diferentes tempos de coleta, em relação a área do pico da solução padrão na concentração 500 µg/mL administrada sobre a pele.

A taxa total de permeação da cafeína foi calculada com base na fórmula:

Taxa total de permeação (µg/cm<sup>2</sup>/h) = Soma da quantidade de cafeína absorvida (µg)/ Área da membrana de pele (cm<sup>2</sup>) / Tempo (h).

#### **4.5 Geração dos esferoides tumorais**

Os esferoides tumorais foram gerados a partir de células CAL27 usando o método de sobreposição líquida conforme descrito anteriormente (Friedrich et al., 2009; Spierri et al., 2021). Os esferoides foram gerados em placas de fundo plano de cultura de células de 96 poços previamente revestidas com agarose a 1,5% (50 µL no total/poço) com diferentes densidades de semeadura (500, 1000, 1500, 2000, 3000 células totais/poço) para promover a formação de um único esferoide por poço. A cada 3-4 dias de incubação, 50% do meio em cada poço foi substituído por meio fresco

(200  $\mu\text{L}$  no total/poço). As células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  por 10 dias e monitoradas a cada 24 horas para análise da formação do esferoide.

Outro modelo testado para gerar esferoides com CAL27 foi a auto montagem em gel de agarose não aderente, com micropoços cilíndricos desenvolvidos usando moldes micrométricos de tamanho 9x9, com diâmetro de 800  $\mu\text{m}$ , que se encaixam em placas de 12 poços (3D Petri Dish®, MicroTissues Inc., St. Louis, MO, USA). Um volume de 500  $\mu\text{L}$  de agarose autoclavada a 2% foi pipetado no molde. Após 6-8 minutos para polimerização, a agarose foi removida do molde e colocada em um poço da placa de 24 poços. Para equilibrar o 3D Petri Dish®, 1 mL de meio de cultura foi adicionado por poço. Duas concentrações de células CAL27 foram testadas para formação de esferoides,  $50 \times 10^4$  e  $100 \times 10^4$ . As células, colocadas em suspensão no meio de cultura, foram colocadas sobre o molde da agarose (150  $\mu\text{L}$ ). A figura 6 representa algumas etapas da geração dos esferoides por esse modelo.

A formação de esferoides foi alcançada incubando a placa a  $37^\circ\text{C}$  com injeção de 5% de  $\text{CO}_2$  e monitorada a cada 24 horas por até 7 dias usando o sistema de imagem Carl ZEISS Axio Vert.A1 com objetiva de 4x e 10x. Os esferoides foram analisados quanto a morfologia e tamanho (diâmetro e área) utilizando o microscópio óptico Carl ZEISS Axio Vert.A1. Imagens de 8-12 esferoides por experimentos foram analisadas.

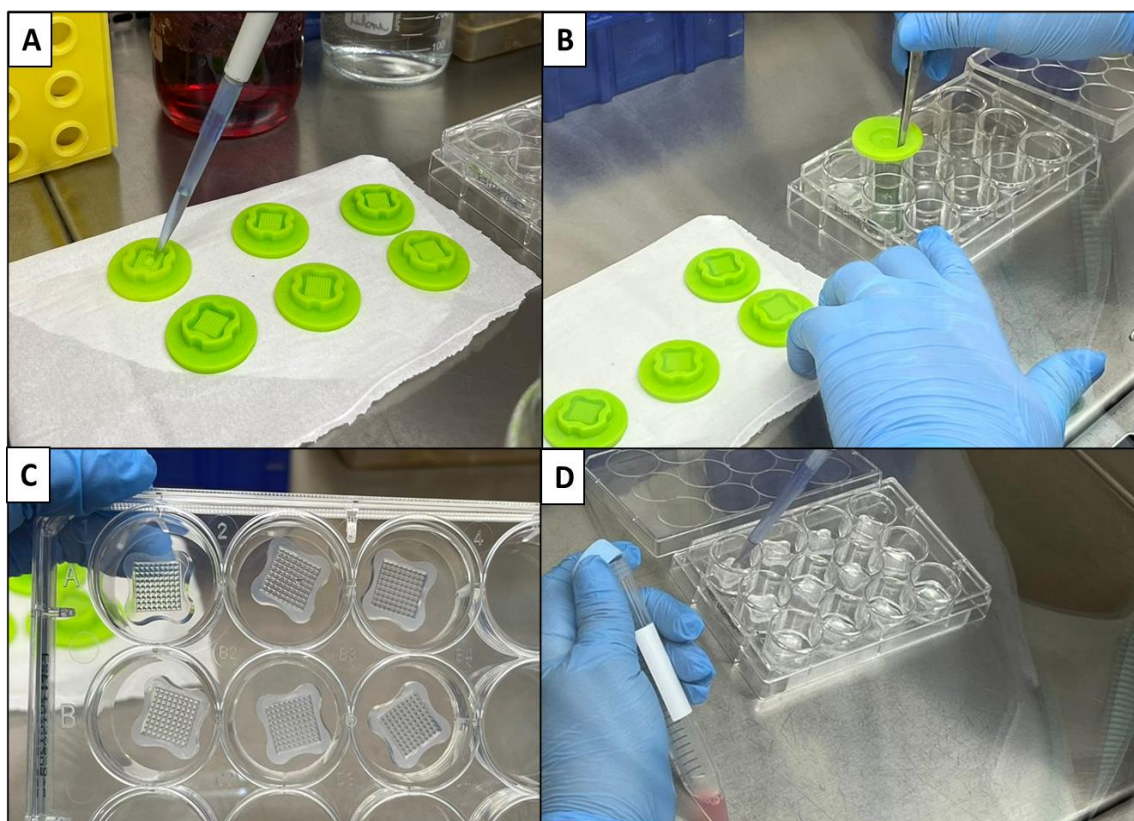


Figura 6: Geração dos esferoides de CAL27 utilizando moldes micrométricos de tamanho 9x9, com diâmetro de 800  $\mu\text{m}$ , que se encaixam em placas de 12 poços (3D Petri Dish®, MicroTissues Inc., St. Louis, MO, USA). A: Aplicação da agarose nos moldes; B: Retirada da agarose dos moldes e transferência para placas de 12 poços; C: Moldes no interior dos poços da placa; D Adição de células no interior dos moldes de agarose.

#### 4.6 Análise dos esferoides

As imagens dos esferoides gerados em placas de 96 poços, previamente cobertos com agarose a 1,5%, foram capturadas nos dias 1, 2, 6 e 10 em microscópio óptico Carl ZEISS Axio Vert.A1. Para os esferoides gerados em micromoldes de agarose, as imagens foram capturadas nos dias 1, 3 e 7. A escala das imagens foi determinada usando uma lâmina de calibração. Após a incubação, cada poço da placa de 96 poços e molde de agarose foram fotografados com objetiva de 4x para monitorar e analisar a integridade e diâmetro dos esferoides. A análise dos esferoides foi realizada por meio de algoritmos de processamento de imagem implementados no

software AxioVision 4.5 (Zeiss), que permite uma seleção confiável e reprodutível da área para determinar o diâmetro e o volume do esferoide. As seguintes informações morfométricas foram obtidas: área do esferoide e diâmetro médio do esferoide.

#### **4.7 Cinética de crescimento dos esferoides**

Os esferoides gerados em placas de cultura celular de fundo plano de 96 poços, previamente cobertas com agarose a 1,5% (50 µL no total por poço), com uma densidade de semeadura de 3000 células por poço e esferoides gerados usando o modelo de micromoldes (MicroTissues® 3D Petri Dish®), com densidades de semeadura de  $50 \times 10^4$  e  $100 \times 10^4$  células foram fotografados no dia 01 e após 10 dias (modelo de 96 poços) e 7 dias (modelo de micromolde) de incubação a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub>. O aumento no diâmetro do esferoide foi calculado dividindo a diferença no diâmetro entre os dias pelo diâmetro no dia 1 (IVANOV ET AL., 2014).

Aumento do Diâmetro (%) =  $(\text{Diâmetro final} - \text{Diâmetro inicial}) * 100 / \text{Diâmetro inicial}$

#### **4.8 Ensaio de viabilidade celular dos esferoides**

A análise da viabilidade celular foi baseada no método de redução da resazurina (forma oxidada) para resofurina (forma reduzida) por células viáveis. Uma solução de Alamar Blue (resazurin 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) 60 µM foi preparada em meio DMEM. 150 µL dessa solução de Alamar Blue foram distribuídos em cada poço e a placa foi incubada por 2 horas. A fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplacas DTX 800 Beckman Coulter Multimode Detector com

excitação em 465 nm e emissão em 540 nm, 4 horas após a adição do corante (IVANOV ET AL., 2014).

#### **4.9 Análise do centro necrótico dos esferoides**

A análise fluorescente do centro necrótico dos esferoides foi realizada por meio da exposição ao Brometo de Etídio (BE)/ Laranja de Acridina (LA) (Sigma-Aldrich). Os esferoides desenvolvidos pelo modelo de micromolde foram lavados com PBS e, em seguida, corados com 5 µg/mL de solução de laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE), e as imagens foram capturadas usando um microscópio Nikon Ti Eclipse com ampliação de 4X. A diferença na permeabilidade do corante na membrana celular intacta permite identificar células viáveis, apoptóticas e necróticas. As células marcadas com fluorescência verde são coradas apenas com laranja de acridina e representam células viáveis, as células necróticas são marcadas com fluorescência vermelha, após exposição ao brometo de etídio.

#### **4.10 Geração do modelo de carcinoma de células escamosas *in situ* (CCE*Insitu-Skin*)**

A montagem da pele humana reconstruída foi realizada como descrito anteriormente para a HaCat-*Skin*. Após 24 horas da adesão dos queratinócitos, esferoides de CAL27 foram retirados dos moldes de agarose com o auxílio de uma pipeta e uma pinça (lavagem com meio de cultivo para retirada) e adicionados sobre a pele humana reconstruída para desenvolvimento do modelo de carcinoma de células escamosas *in situ* (CCE*Insitu-Skin*). Após 24 horas, o meio de cultivo da pele foi



retirado do interior do inserto para permitir a interface ar-líquido. Os tecidos foram mantidos por 10 dias em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub> para proliferação das células e análise da formação do carcinoma de células escamosas *in situ*. A troca de meio da parte externa ao inserto foi feita a cada dois dias.

As peles reconstruídas foram fixadas em formol a 10% tamponado, desidratadas e embebidas em parafina. As lâminas contendo corte de 3,5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação morfológica e estrutural dos tecidos. As imagens foram analisadas e obtidas por microscopia óptica e analisadas com o Imaging Software NIS-Elements 4.30.01 (Nikon Instruments, Melville, NY).

#### **4.11 Avaliação da aplicabilidade dos modelos CCE-Skin e CCE *insitu*-Skin**

##### 4.11.1 Substâncias

Foram escolhidas 2 (duas) substâncias para serem testadas sobre os modelos, a 22-βhidroxitingenona por ser uma substância cujos resultados preliminares de citotoxicidade em Cal27 foram promissores e sua atividade antimelanoma também vem sendo investigada pelo nosso grupo de pesquisa (ARANHA et al., 2020, 2021), e a cisplatina, por ser uma das alternativas de tratamento não-cirúrgico padrão do carcinoma de células escamosas.

A 22-HTG foi cedida pelo professor Doutor Hector Henrique Ferreira Koolen da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Os caules e pecíolos foliares de *S. impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae) foram coletados na Reserva Adolpho Ducke sob coordenadas 2°56'58.2" S, 59°56'36.3" W, na cidade de Manaus,

Amazonas, Brasil. Uma amostra do espécime (#4699) foi depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil. O acesso foi registrado sob o número: A715C2F no SisGen - Sistema Nacional de Gestão de Recursos Genéticos e Conhecimento Tradicional Associado do Brasil. Todo o processo de obtenção da 22-HTG foram descritos anteriormente (ARANHA et al., 2020, 2021; DA SILVA et al., 2016)

#### 4.11.2 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo (KANDÁROVÁ et al., 2009; OECD TG 439, 2015) utilizando o método do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobrometo). Como controle negativo foi utilizado 10 µL de tampão fosfato salina (PBS) por pele e cisplatina como fármaco padrão. As substâncias foram testadas nos modelos *HaCat-Skin*, *CCE-Skin* e *CCEinsitu-Skin*, em concentrações selecionadas no ensaio de citotoxicidade em monocamada para a 22-hidroxitengenona e cisplatina (10µM) durante 48h. As peles foram expostas às substâncias, retiradas dos insertos e transferidas para poços de uma placa de 24 poços, lavadas com PBS e incubadas com 300 µL de MTT (1 mg/mL) a 37°C em estufa com CO<sub>2</sub> a 5%. O meio de cultivo das peles foi coletado e armazenado no ultrafreezer para realização dos testes de zimografia. Após 3 horas de incubação, o excesso de MTT foi removido e o tecido lavado com PBS. Os sais de formazan foram diluídos em 2 mL de isopropanol durante 2 horas. Em seguida, 200µL da solução de extração foi transferida para uma placa de 96 poços em triplicata e a densidade óptica do corante púrpura resultante medida em 570 nm utilizando um leitor de placas ELISA (DTX 800 - Beckman Coulter).

#### 4.11.3 Análise morfológica dos tecidos

As amostras dos tecidos CCE-*Skin* e CCE*insitu-Skin* não tratadas e tratadas com as substâncias teste foram fixadas em formol a 10%, desidratadas e embebidas em parafina. As lâminas contendo corte de 3,5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação morfológica e estrutural da pele. As imagens foram analisadas e obtidas por microscopia óptica e analisadas com o Imaging Software NIS-Elements 4.30.01 (Nikon Instruments, Melville, NY) (COLLEY et al., 2011; PENNACCHI; ARAU; FAGUNDES, 2015).

#### 4.11.4 Zimografia em gel de poliacrilamida

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de zinco que degradam proteínas por clivagem das ligações peptídicas e estão envolvidas com o processo de invasão celular, degradação da cartilagem, remodelamento tecidual e outros processos correlacionados com a patogênese de doenças, como artrite reumatoide, câncer e doença pulmonar obstrutiva crônica (HU; BEETON, 2010).

A atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz foi avaliada por meio da degradação do substrato e por seu peso molecular em gel de poliacrilamida. Nessa técnica, 30 µg de proteínas (previamente dosadas pelo método de Bradford) presentes no sobrenadante dos tecidos tratados foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, copolimerizado com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e com o

substrato gelatina para avaliação das atividades proteolíticas das metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP2 e MMP9). A eletroforese foi conduzida durante 30 minutos a 70 Volts, seguido por mais 90 minutos a 120 Volts. Após a eletroforese, as enzimas foram renaturadas pela remoção do SDS através da lavagem do gel com uma solução aquosa de TRITON X-100 2,5% e incubadas a 37°C durante 18 horas com tampão (0,05 M TrisHCl - pH 8, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 µM ZnCl<sub>2</sub>) para degradação do substrato no gel. Em seguida, o gel foi corado com solução de azul brilhante de Comassie 0,5% durante 30 minutos e descorado com uma solução de metanol 40% e ácido acético 10% até a percepção de bandas incolores, em contraste com o fundo azul do gel. As áreas das bandas formadas no gel foram quantificadas por densidade de pixels utilizando software ImageJ (HU; BEETON, 2010; LEBER; BALKWILL, 1997; SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005; VANDOOREN et al., 2013).

#### 4.11.5 Zimografia *in situ*

As MMPs (Metalloproteinases de Matriz) são enzimas que desempenham um papel importante na degradação e remodelação da matriz extracelular. A zimografia *in situ* é uma técnica utilizada para detectar e visualizar a atividade das MMPs diretamente em tecidos ou amostras biológicas.

A avaliação das MMPs foi realizada usando DQ™ Gelatin (EnzChek™ Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), um substrato de gelatina que é marcado com fluorescência e se torna brilhante quando degradado pelas MMPs. Essa técnica permite detectar a atividade das MMPs no local específico em que ocorre a degradação da gelatina. Para o preparo da gelatina, 1 mL de PBS foi adicionado a

1mg de gelatina. A inibição da metaloproteinases foi demonstrada aplicando-se 80µL da solução de gelatina do kit (DQ™ Gelatin) sobre os tecidos após 2 horas de incubação em câmara úmida.

Após incubação, os tecidos foram visualizados no microscópio usando filtro FITC ( $\lambda_{ex}$  BP 460–500 nm/ $\lambda_{em}$  BP 512–542 nm) com aumento de 20x e a intensidade da fluorescência foi definida (MARTINEZ-GARCIA et al., 2022).

#### **4.12 Análise estatística**

Os resultados de todos os ensaios foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e analisados estatisticamente, usando o software GraphPad Prism 6. Teste *t student* ou Análise de Variância One-Way (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (*Multiple Comparison Test*) ou ANOVA 2way seguido de Bonferroni *posttest* foram utilizados. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $*p < 0,05$ , frente aos controles.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Padronização da HaCat-Skin e aplicação para ensaios de irritação**

O modelo de pele Humana Reconstruída com linhagens celulares de MRC5 e HaCat (HaCat-Skin) desenvolvido em nosso laboratório, sem suplementação do cultivo com Soro Fetal Bovino e Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF), apresentou duas camadas principais, a epiderme composta de queratinócitos, e a

derme, composta de fibroblastos embebidos em uma matriz de colágeno tipo I (Figura 7).

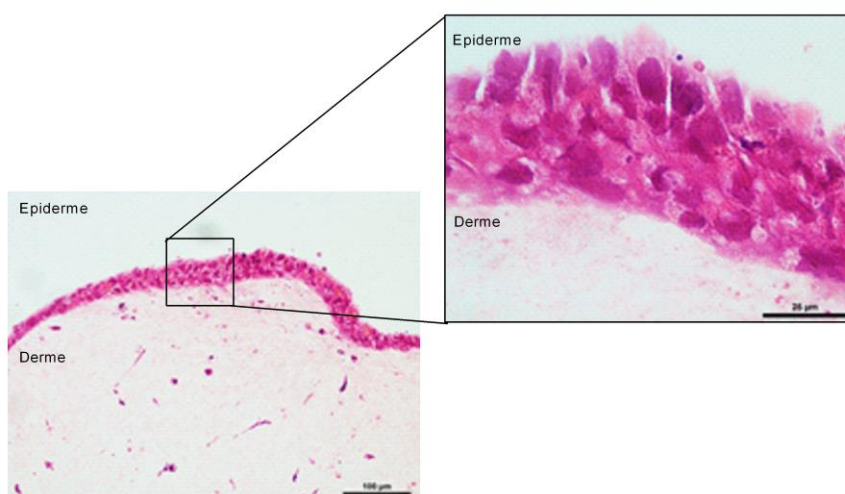


Figura 7: Cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina do modelo de pele humana reconstruída com linhagens celulares de fibroblasto humano (MRC5) e queratinócito humano (HaCat) – HaCat-Skin. Barras de escala: 100µm e 25µm.

Durante os testes de padronização do modelo de pele humana reconstruída no laboratório, houve a necessidade de substituir o colágeno tipo I da Corning® (3,8 mg/mL) para o da GIBCO (3 mg/mL). Com isso, testes de padronização da concentração do colágeno foram feitos para reproduzir o modelo desenvolvido e a concentração que permitiu a melhor evidência das duas camadas de tecido, epiderme e derme, com confirmação da função barreira foi 2,17 mg/mL de colágeno tipo I.

A concentração de colágeno tipo I desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da pele humana reconstruída *in vitro*. O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural encontrada na pele e é responsável por fornecer resistência e elasticidade aos tecidos. Ao cultivar células da pele em um ambiente *in vitro*, a adição de colágeno tipo I influencia vários aspectos do desenvolvimento e da função da pele reconstruída. Dentre eles: arquitetura e organização da matriz extracelular, uma vez

que é o colágeno que forma a matriz extracelular tridimensional, e se a concentração for muito elevada tende a resultar em uma matriz muito densa e dificultar o desenvolvimento da célula, incluindo a proliferação celular e também migração celular, já que concentrações apropriadas de colágeno tipo I podem facilitar a migração celular adequada, permitindo a formação correta das camadas da pele reconstruída *in vitro* (KINSNER; LESIAK-CYGANOWSKA; SLADOWSKI, 2001; SUGIHARA et al., 2001).

Ainda como teste essencial de padronização do modelo, realizou-se o ensaio de irritação, onde foram testadas 5 substâncias reconhecidamente não irritantes e 6 irritantes, como mostrado na figura 05. Na tabela 01 estão os parâmetros do teste utilizados no modelo em comparação com os modelos reconhecidos e validados pela OECD. O modelo de pele conseguiu diferenciar as substâncias não-irritantes, as quais apresentam viabilidade celular acima de 50% e as irritantes, viabilidade celular abaixo de 50%.

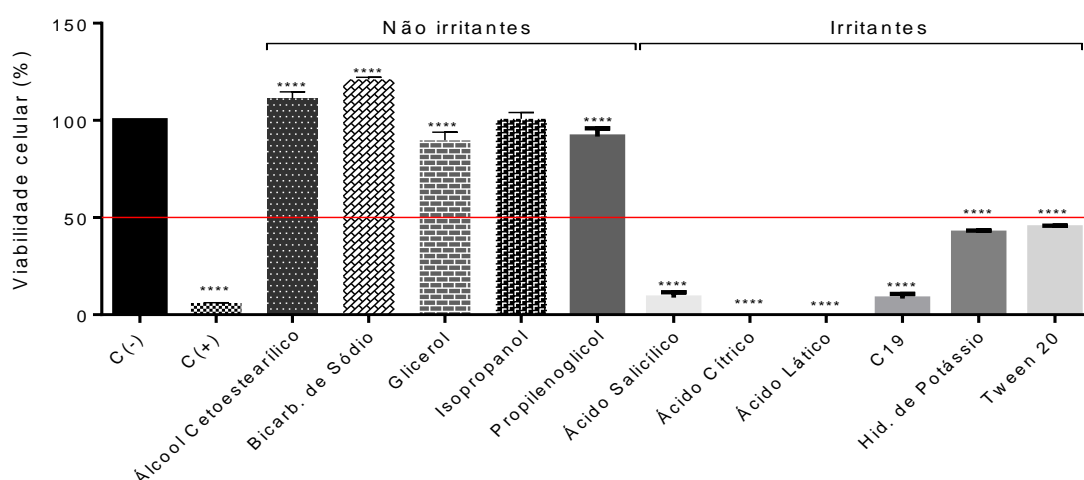


Figura 8: Resultados do ensaio de irritação cutânea em modelo de pele humana reconstruída com linhagem celular de queratinócitos humano e fibroblastos humanos embebidos em colágeno tipo I (HaCat-Skin). Foram testadas cinco substâncias reconhecidamente não-irritantes (5) e irritantes (6) segundo as diretrizes da OECD. O modelo de pele conseguiu diferenciar as substâncias não-irritantes (viabilidade celular acima de 50%) e as irritantes (viabilidade celular abaixo de 50%). Valor de p: (\*\*)  $p < 0.01$  (\*\*\*)  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

Os parâmetros experimentais definidos para o modelo HaCat-Skin para estudos de aplicabilidade para ensaios de irritação, dentre outros, como citotoxicidade, foram definidos com base nos parâmetros dos protocolos específicos dos métodos validados pela OECD (TG 439) das peles EpiSkin™, EpiDERM™, EpiDERM™ e Epiderme – USP (PEDROSA; CATARINO; PENNACCHI, 2017).

Na Tabela 2 estão apresentados esses parâmetros e o comparativo com os modelos de pele reconhecidamente validados de acordo com a OECD e o modelo de Pedrosa, Catarino e Pennacchi (2017). Todos os parâmetros definidos para a HaCat-Skin são semelhantes a esses modelos, diferenciando apenas no tempo de extração com o Isopropanol que foi menor (1 hora), uma vez que já foi observado nesse tempo a estabilidade da leitura.

A finalidade dos ensaios de irritação em modelos de pele reconstruída *in vitro*, para pesquisa de novos fármacos, é avaliar o potencial de irritação ou toxicidade desses compostos quando aplicados na pele. Esses ensaios são conduzidos para determinar se um fármaco ou produto causa reações adversas na pele, como vermelhidão, inchaço, coceira ou outros sinais de irritação. Esses ensaios são importantes para garantir a segurança das substâncias e evitar danos à pele dos usuários. Os resultados obtidos nesses ensaios podem ajudar os pesquisadores a identificar e desenvolver fármacos mais seguros e eficazes, além de fornecer informações para a formulação e aplicação adequada dos produtos farmacêuticos (PEDROSA; CATARINO; PENNACCHI, 2017; VINARDELL; MITJANS, 2008).



Tabela 2: Parâmetros dos protocolos específicos dos métodos validados pelo guia OECD 439 em comparação com os parâmetros definidos do modelo de pele humana reconstruída da HaCat-Skin.

	<b>EpiSkin™</b>	<b>EpiDERM™</b>	<b>SkinEthic RHE™</b>	<b>Epiderme - USP</b>	<b>HaCat-Skin</b>
<b>Tratamento</b>					
Controle negativo	PBS	DPBS	PBS	PBS	PBS
Controle Positivo	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%
Volume	10 µL	30 µL	16 µL	10 µL	10 µL
Uso de mesh de nylon	Não	Se necessário	Sim	Não	Não
Temperatura de aplicação	Ambiente	Ambiente 25' 37°C 35'	Ambiente	Ambiente	Ambiente
Tempo de incubação	42 ± 1 h	24 ± 2 h e 18 ± 2 h	42 ± 1 h	42 ± 1 h	42 ± 1 h
<b>Ensaio de MTT</b>					
Concentração	0,3 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
Tempo de aplicação	3 h ± 5'	3 h ± 5'	3 h ± 5'	3 h ± 5'	3 h ± 5'
Reagente de extração	Isopropanol ácido	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol
Volume de extração	2 mL	2 mL	700 µL	2 mL	2 mL
Tempo de extração	4 h ou <i>overnight</i>	2 h	2 h	2 h	1 h
Desvio padrão (SD) entre as replicatas de tecidos	18 ≤ SD	18 ≤ SD	18 ≤ SD	18 ≤ SD	18 ≤ SD

DPBS: Dulbecco's – Tampão fosfato salina.

Fonte: Adaptado de (OECD TG 439, 2015; PEDROSA; CATARINO; PENNACCHI, 2017).

Os testes de irritação que utilizam pele humana reconstruída *in vitro*, avaliam o dano celular/tecidual por meio da análise da viabilidade celular como ponto final, uma vez que os testes de irritação, até mesmo corrosão, dependem da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pelas células que compõem o tecido. A classificação de “irritante” é atribuída às substâncias que conseguem reduzir a viabilidade celular abaixo dos limites estabelecidos, ou seja,  $\leq 50\%$  (Categoria 2 do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos – GSH) e “não irritante” para aquelas cuja viabilidade celular mensurada pelo ensaio do MTT é mantida maior que 50% (FILAIRE et al., 2022; OECD TG 439, 2015).

## **5.2 Ensaio de permeação em modelo de pele humana reconstruída**

A permeação de uma substância em uma célula de Franz refere-se à capacidade da mesma atravessar a pele quando aplicada topicamente. O método da célula de Franz é comumente utilizado para avaliar a taxa de permeação de substâncias através da pele, simulando as condições de aplicação tópica em um ambiente controlado. Durante o teste de permeação em uma célula de Franz, a pele é colocada entre duas câmaras, uma contendo a solução de substância a ser testada e a outra contendo um meio de recepção. Ao longo de um determinado período de tempo, pequenas amostras do meio de recepção são coletadas e analisadas para determinar a quantidade de substância que atravessou a pele (CLOWES; SCOTT; HEYLINGS, 1994; FRANZ, 1975; PULSONI et al., 2022).

A permeação da cafeína através da pele humana reconstruída HaCat-Skin foi determinada com base na porcentagem da dose recuperada no fluido receptor, até 4 horas da administração. Os resultados das medições por tempo são mostrados na figura 9. A permeação da cafeína aumentou com o passar do tempo. Entretanto, o percentual total de cafeína presente no fluido receptor, permeado dentro das 4 horas após a administração, foi  $26,38 \pm 0,3\%$ . Considerando o tempo máximo de permeação 4 horas, a taxa total de permeação da cafeína na HaCat-Skin foi  $0,558 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ .

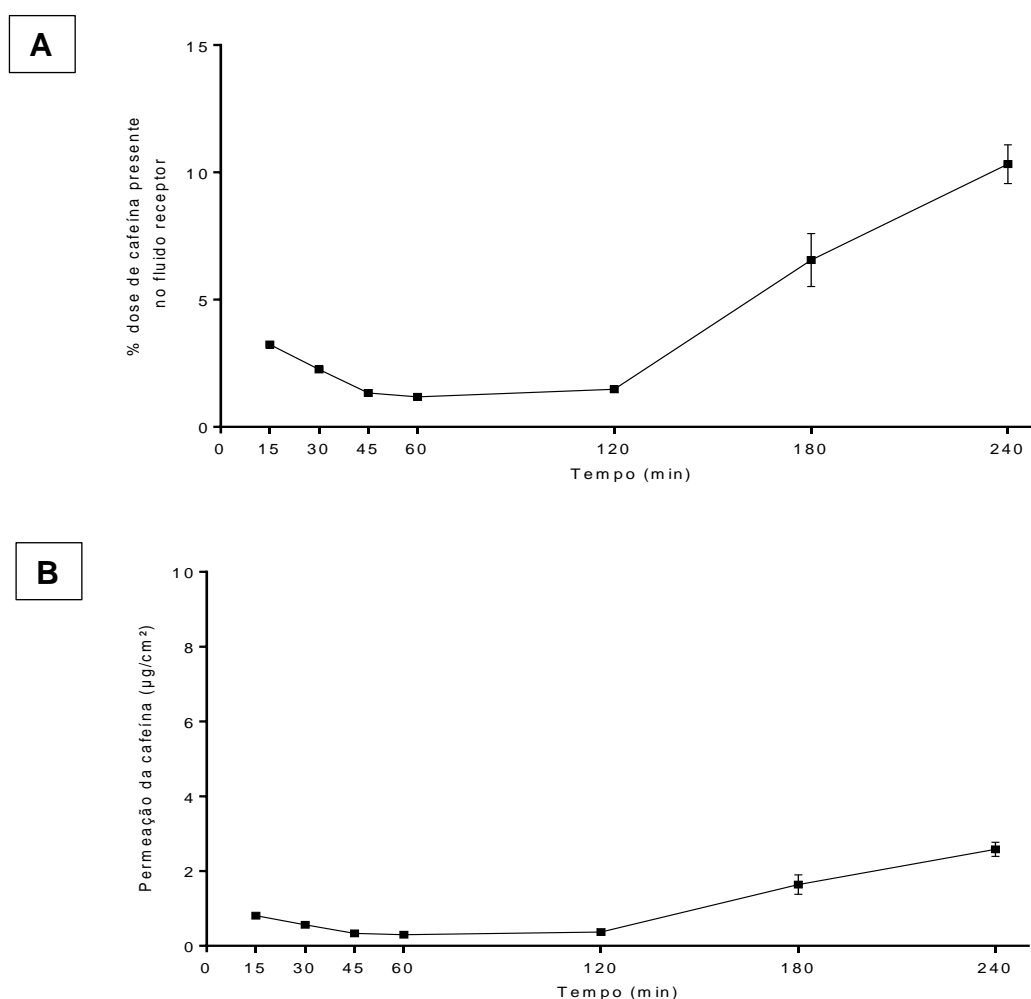


Figura 9: Permeação cutânea *in vitro* da cafeína em modelo de pele humana reconstruída Haca-Skin. A: Permeação expressa em percentual da dose de cafeína presente no fluido receptor versus tempo em minutos. B: Permeação da cafeína expressa em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de pele presente no fluido receptor versus tempo em minutos.

Um estudo de comparação multicêntrico, que avaliou as previsões *in vitro* da absorção cutânea de cafeína, testosterona e ácido benzoico, apontou que a quantidade média da cafeína presente no fluido receptor após 24 horas em pele humana foi de  $24,5 \pm 11,6\%$  da dose aplicada (9 laboratórios). Em peles de ratos, os resultados apontaram que a quantidade presente no fluido receptor após 24 horas foi de  $53,7\%$  (VAN DE SANDT et al., 2004).

Vale ressaltar que a permeação da cafeína na pele *in vitro* pode variar dependendo das condições experimentais e das características da pele utilizada nos estudos. Segundo estudo que avaliou os resultados dos ensaios de pré-validação das epidermes humanas reconstruídas para testes de absorção cutânea, a taxa de permeação da cafeína na pele humana, após 6 horas da administração, foi de  $1,12 \pm 1,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , o que representa aproximadamente  $0,19 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Na pele de porco a permeação da cafeína apresentou taxa de  $0,08 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ , EpiDerm  $0,81 \pm 0,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ , *SkinEthic*  $12,3 \pm 6,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  e *EPISKIN*  $8,54 \pm 1,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (SCHÄFER-KORTING et al., 2006). Esses resultados, bem como os obtidos no nosso estudo, comprovam que existe muita variação da permeação da cafeína nos modelos de pele humana reconstruída e a permeação do modelo HaCat-*Skin* ocorre muito mais rápido comparado aos modelos validados da OECD, uma vez que as medições foram feitas no tempo máximo de 4 horas.

A pele é composta por várias camadas, sendo a camada externa, conhecida como estrato córneo, a principal barreira para a penetração de substâncias. A cafeína, devido ao seu tamanho molecular relativamente pequeno e lipofilicidade moderada, consegue atravessar essa camada lipídica do estrato córneo. Como não foi possível

visualizar o estrato córneo no modelo HaCat *Skin*, isso possivelmente influenciou na permeação da cafeína, fazendo com que fosse muito mais rápida em comparação com os modelos de pele validados da OECD. A permeação da cafeína na pele *in vitro* pode ser influenciada por fatores como a concentração da solução de cafeína, o pH da formulação, a presença de outros ingredientes ou veículos na formulação, a duração do contato com a pele, a temperatura, a umidade relativa durante o teste, integridade da pele, entre outros (MILLER et al., 2017; TROMMER; NEUBERT, 2006).

### **5.3 Formação dos esferoides de CAL27**

A fim de avaliar o comportamento das células para formação dos esferoides, dois modelos de geração foram testados: o modelo com a placa de 96 poços recoberta com agarose e o modelo de micromolde (MicroTissues® 3D Petri Dish®). Na figura 10 é possível observar os microtecidos gerados na placa de 96 poços, em que se verifica a formação dos esferoides apenas na concentração de 3000 células por poço após 10 dias de incubação. Os esferoides gerados por esse modelo apresentaram uma retração de volume a cada dia de incubação, chegando ao diâmetro médio de 124,3 µm no décimo dia, na concentração inicial de 3000 células por poço. Nas outras concentrações de células testadas não houve formação dos esferoides e ao agitar a placa, os mesmos se desfaziam e as células voltavam a ficar dispersas no poço.

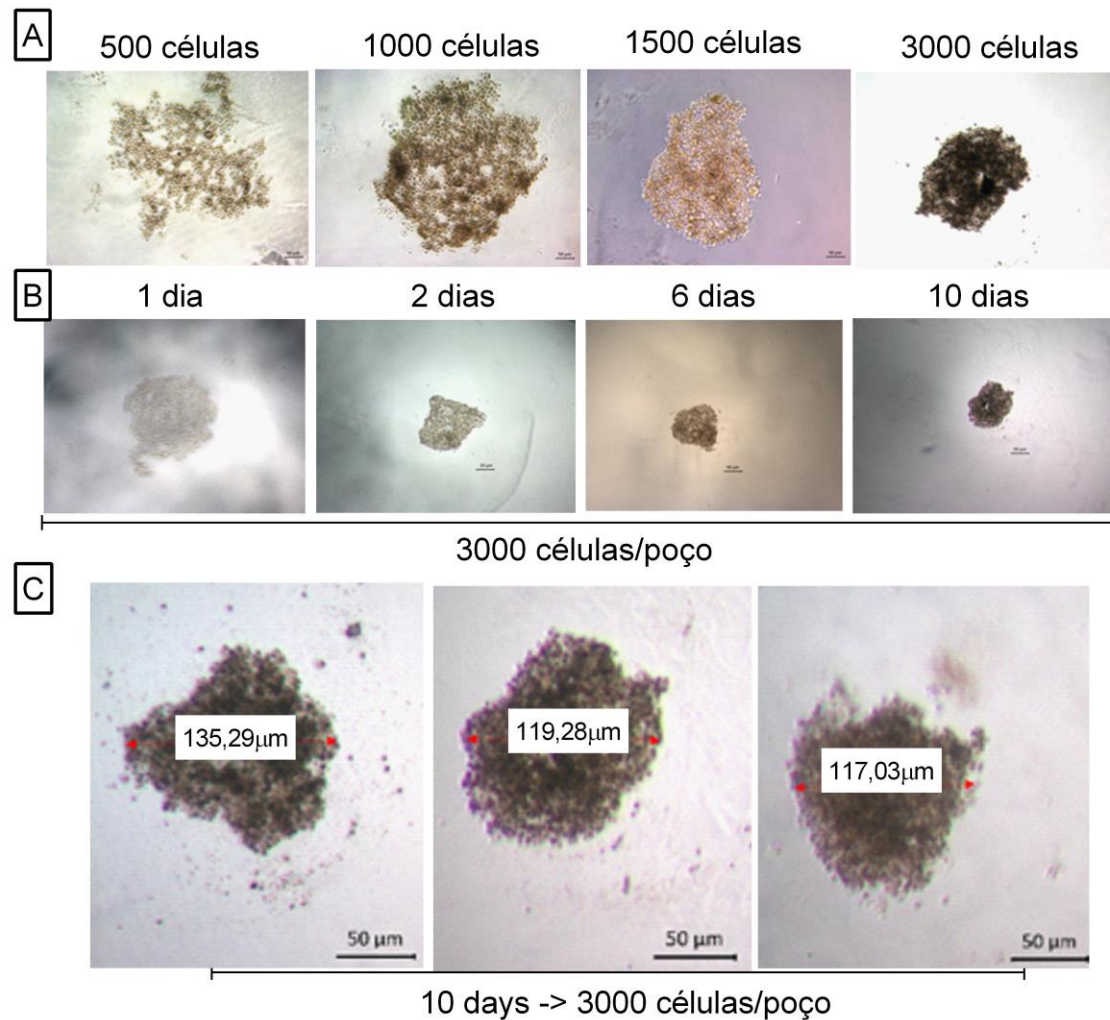


Figura 10: Monitoramento do crescimento dos esferoides gerados no modelo de placa de 96 poços recobertos com agarose. A: Diferentes concentrações de células testadas por poço; B: Acompanhamento diário da formação dos esferoides iniciados com 3000 células por poço; C: Imagens dos esferoides com a identificação do diâmetro após 10 dias de cultivo iniciados com 3000 células por poço. Imagens capturadas utilizando microscópio Primovert Carl Zeiss. Barra de escala 50 μm.

Para formação dos esferoides no modelo em placa de 96 poços, foram testadas diferentes concentrações de CAL27: 500, 1000, 1500 e 3000 células por poço. Contudo, verificou-se que as células não formaram estruturas esféricas estáveis e com as renovações do meio de cultura visualizou-se uma desagregação celular, mesmo na melhor condição identificada de 3000 células por poço, o que impossibilitou estudos mais detalhados com os esferoides gerados por esse modelo.

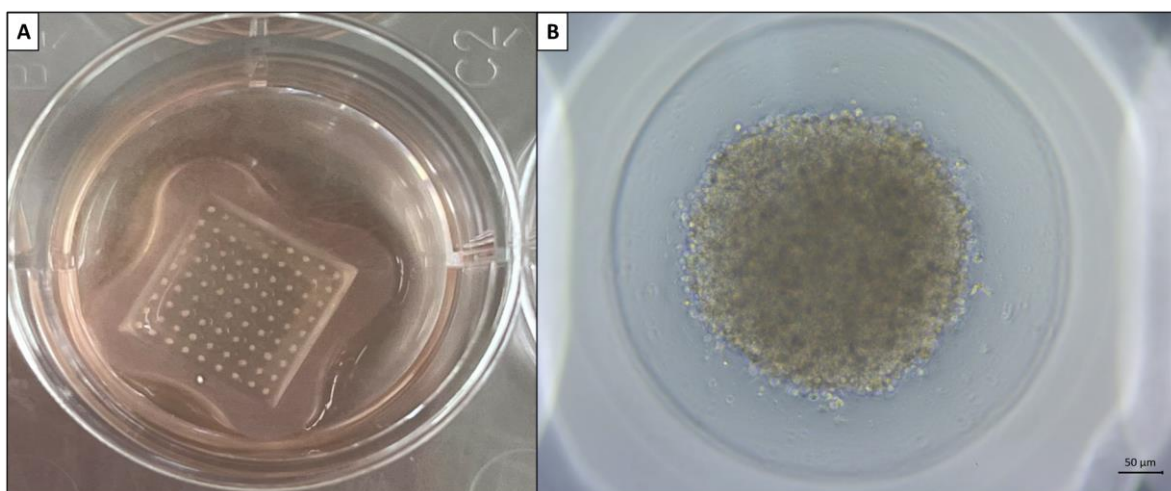


Figura 11: Esferoides de CAL27 formados após 7 dias de cultivo utilizando moldes micrométricos de tamanho 9x9, com diâmetro de 800  $\mu\text{m}$ , que se encaixam em placas de 12 poços (3D Petri Dish®, MicroTissues Inc., St. Louis, MO, USA). A: Esferoides formados em molde de agarose visualizados no poço de uma placa com 12 poços. B: Esferoide de CAL27 (plaqueamento inicial de  $100 \times 10^4$  células) visualizado em microscópio óptico com objetiva de 4X.

Os esferoides gerados com o modelo do micromolde apresentaram resultados mais promissores comparado ao modelo da placa de 96 poços. Na figura 11-A é possível observar os esferoides no molde de agarose sem o auxílio do microscópio óptico e na figura 11-B visualizados no microscópio com aumento de 40X. Optamos testar esse modelo com a CAL27 para os estudos posteriores, considerando a necessidade de otimização da formação de esferoides em qualidade e quantidade, de forma que fosse facilmente reproduzível e implementado em outros laboratórios.

A técnica de geração de esferoides com micromoldes é simples, oferece fácil controle sobre o tamanho do poço e é compatível com as técnicas existentes, uma vez que as células são confinadas espacialmente e os micropoços atuam como centros de ligação celular para auto-agregação. Os esferoides gerados em micropoços são mais homogêneos em tamanho em comparação com aqueles gerados por técnicas convencionais (LEE; KIM, 2021). Isso pode ser comprovado por

meio da análise da figura 12, onde é possível visualizar os microtecidos no micromolde em dias diferentes de cultivo. No segundo dia de cultivo, já é possível observar um agregado de células mais estável e uniforme nas duas concentrações testadas de CAL27,  $50 \times 10^4$  e  $100 \times 10^4$  células adicionadas por micromolde.

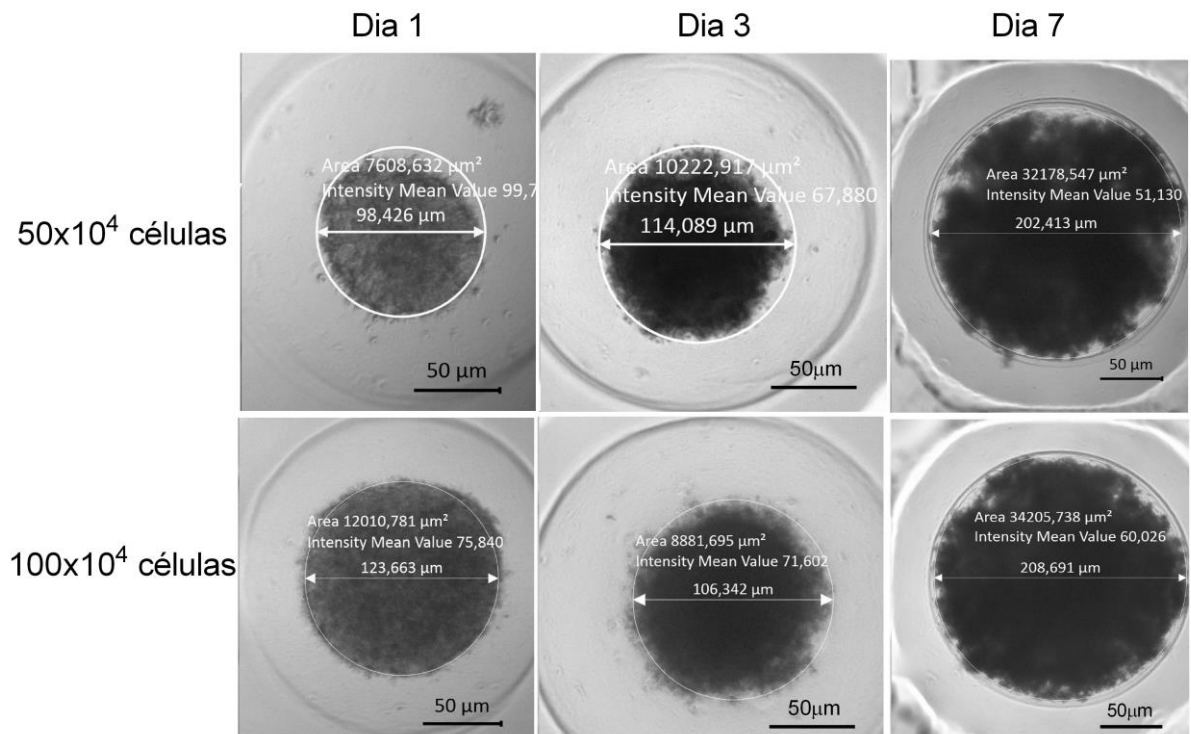


Figura 12: Crescimento dos esferoides gerados com micromoldes de agarose (MicroTissues® 3D Petri Dish®) no dia 1, dia 3 e dia 7 de cultivo, com concentrações iniciais de plaqueamento  $50 \times 10^4$  e  $100 \times 10^4$  células por molde. Intensity Mean Value: Valor Médio de Intensidade. Barras de escala: 50µm.

#### 5.4 Análise do diâmetro dos esferoides e cinética de crescimento

Um dos primeiros estudos que utilizaram o modelo de co-cultura 3D demonstrou que, com o passar dos dias, a tendência é que o diâmetro dos esferoides de linhagens tumorais aumente em comparação com as linhagens não tumorais (RAMA-ESENDAGLI et al., 2014). Em um dia de idade, os esferoides de CAL27 gerados pelo modelo MicroTissues® 3D Petri Dish® apresentaram diâmetro  $91,88 \pm 4$



$\mu\text{m}$  na densidade inicial de  $50 \times 10^4$  células comparadas a  $131,07 \pm 4 \mu\text{m}$  na densidade inicial de  $100 \times 10^4$  células com diferença estatisticamente significativa (Figura 13). O mesmo efeito foi observado após 7 dias de cultivo, com  $100,61 \pm 10 \mu\text{m}$  de diâmetro para a densidade  $50 \times 10^4$  células e  $183,97 \pm 15 \mu\text{m}$  de diâmetro para a densidade  $100 \times 10^4$  células (Figura 13).

O crescimento esferoide, como o de tumores sólidos, é caracterizado por uma fase inicial de aumento de volume seguida por uma 'esferoidização/ tempo de estabilização' em que os esferoides se tornam mais regulares em forma e diminuem de volume até atingirem uma espécie de equilíbrio. Esta fase é essencial para o complexo estrutural e organização funcional do esferoide (ZANONI et al., 2019).

Densidades muito baixas de células no processo inicial de geração dos esferoides resultaram em esferoides menores após o período de crescimento. As maiores densidades de células testadas em ambos os modelos apresentaram esferoides maiores. O crescimento dos esferoides pelo modelo de geração 3D Petri Dish® apresentou 9,4% de crescimento calculado dividindo a diferença no diâmetro do esferoide entre os dias pelo diâmetro no dia 1, na concentração de  $50 \times 10^4$  células, comparado a 40,36% na concentração de  $100 \times 10^4$  células após 7 dias de cultivo.

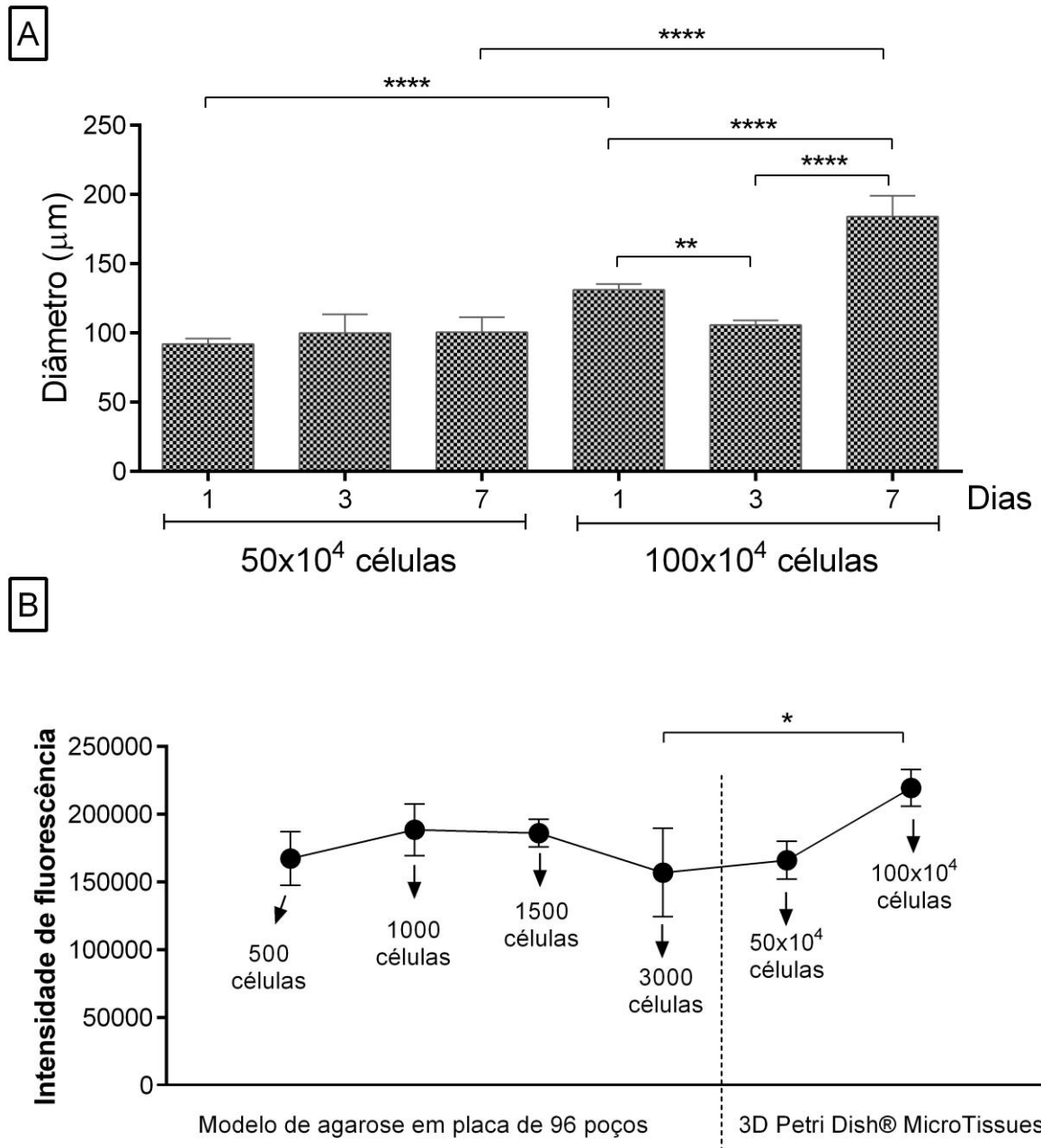


Figura 13: Monitoramento do crescimento de esferoides por análise do diâmetro e intensidade de fluorescência usando o método Alamar Blue. A - Diâmetro dos esferoides gerados com o modelo de Placa de Petri 3D MicroTissues®; B - Intensidade de fluorescência dos esferoides gerados com a placa de agarose e o modelo de Placa de Petri 3D MicroTissues®. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Valor de p: (\*\*)  $p < 0.01$  (\*\*\*)  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

Vários fatores podem influenciar a cinética de crescimento dos esferoides tumorais. Alguns dos principais fatores incluem tipo de célula, uma vez que diferentes

tipos de células tumorais podem apresentar taxas de crescimento diferentes em esferoides, densidade celular inicial, meio de cultura, matriz extracelular, oxigênio de nutrientes, interação celular, dentre outros (CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017; FENNEMA et al., 2013; FRIEDRICH et al., 2009; LEE; KIM, 2021).

Diferentes tipos de células tumorais podem apresentar taxas de crescimento diferentes em esferoides. Isso pode estar relacionado à sua origem, características genéticas e propriedades intrínsecas. A densidade de células usada para iniciar o cultivo dos esferoides pode afetar sua taxa de crescimento. Densidades mais altas podem resultar em um crescimento mais rápido, enquanto densidades mais baixas podem levar a um crescimento mais lento. A composição adequada do meio de cultura é crucial também para fornecer as condições ideais de crescimento. A matriz extracelular fornece suporte estrutural e influencia a migração, proliferação e diferenciação das células. Todos esses fatores devem ser levados em consideração ao projetar e analisar experimentos com esferoides tumorais, pois eles podem afetar os resultados e a interpretação dos estudos (CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017; FRIEDRICH et al., 2009; ISHIGURO et al., 2017; MEHTA et al., 2012; SAKALEM et al., 2021).

### **5.5 Capacidade dos esferoides em reduzir a resazurina e tratamento com a 22- $\beta$ hidroxitingenona**

Como as estruturas dos esferoides são, por muitas vezes, irregulares, o diâmetro não é uma medida precisa para avaliar a densidade. Com isso, a intensidade da fluorescência pode servir também para avaliação da densidade celular. Além disso, para elucidar a viabilidade de utilização do modelo como uma plataforma para ensaios

de avaliação da viabilidade celular para prospecção de novas moléculas terapêuticas, o método de redução da resazurina (forma oxidada) para resofurina (forma reduzida) – Alamar Blue foi escolhido.

Em modelo 3D, após aplicação da solução de Alamar Blue, a intensidade de fluorescência foi analisada e não houve diferença significativa entre os resultados utilizando o modelo de geração dos esferoides em placa de 96 poços recoberta com agarose. No modelo MicroTissues® 3D Petri Dish® observou-se uma tendência de aumento na intensidade de fluorescência com o aumento da densidade inicial de células. A intensidade de fluorescência foi maior na densidade inicial de células de  $100 \times 10^4$  comparada a 3000 células do modelo gerado em placa de 96 poços com agarose (Figura 13B).

Para seleção das concentrações teste da 22- $\beta$ hidroxitingenona (22-HTG) em modelo tridimensional, a substância foi testada em modelo de monocamada para determinação das Concentrações Inibitórias de 50% (CI50), nas diferentes linhagens celulares de fibroblasto humano (MRC5), queratinócito humano (HaCat) e carcinoma de células escamosas (CAL27). A 22-HTG apresentou atividade citotóxica frente a todas as linhagens testadas e não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos nos tempos de tratamento de 48 e 72 horas (Tabela 3). Com isso, o tempo de tratamento de 48 horas foi selecionado para os ensaios em pele humana reconstruída.

Tabela 3: Viabilidade celular de fibroblastos humanos (MRC5), queratinócitos humanos (HaCat) e linhagem de carcinoma de células escamosas (CAL27) após tratamento com a 22-HTG de 24, 48 e 72 horas. DOX: Doxorrubicina.

<b>CI 50% em <math>\mu\text{M}</math></b> (Intervalo de confiança de 95%)									
	<b>MRC5</b>			<b>HACAT</b>			<b>CAL27</b>		
<b>Tempo de tratamento (horas)</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>22-HTG</b>	2,448 (2,1-2,8)	2,088 (1,9-2,3)	1,921 (1,8-2,1)	6,536 (0,5-8,8)	2,258 (1,8-2,8)	3,757 (2,7-3,9)	5,154 (4,4-5,9)	3,014 (1,8-3,3)	1,698 (1,5-1,9)
<b>DOX</b>	3,903 (3,2-4,8)	0,4323 (0,4-4,8)	0,34 (0,3-0,4)	0,3140 (0,3-0,4)	0,0257 (0,1-0,5)	0,0498 (0,01-0,05)	3,020 (2,1-4,3)	0,031 (0,01-0,05)	0,006 (0,002-0,02)

O tratamento dos esferoides (Cal 27) com 22-HTG utilizando o modelo do micromolde, promoveu uma diminuição do diâmetro dos esferoides após tratamento com 22-HTG nas concentrações 1 e 2,5 $\mu\text{M}$ , com inibição do crescimento celular em torno de 10% nas concentrações testadas. A viabilidade celular no modelo de esferoide foi reduzida na presença da 22-HTG nas três concentrações testadas comparado ao controle negativo. A atividade citotóxica da 22-HTG na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  foi semelhante à da cisplatina testada na concentração de 10 $\mu\text{M}$  (Figura 14).

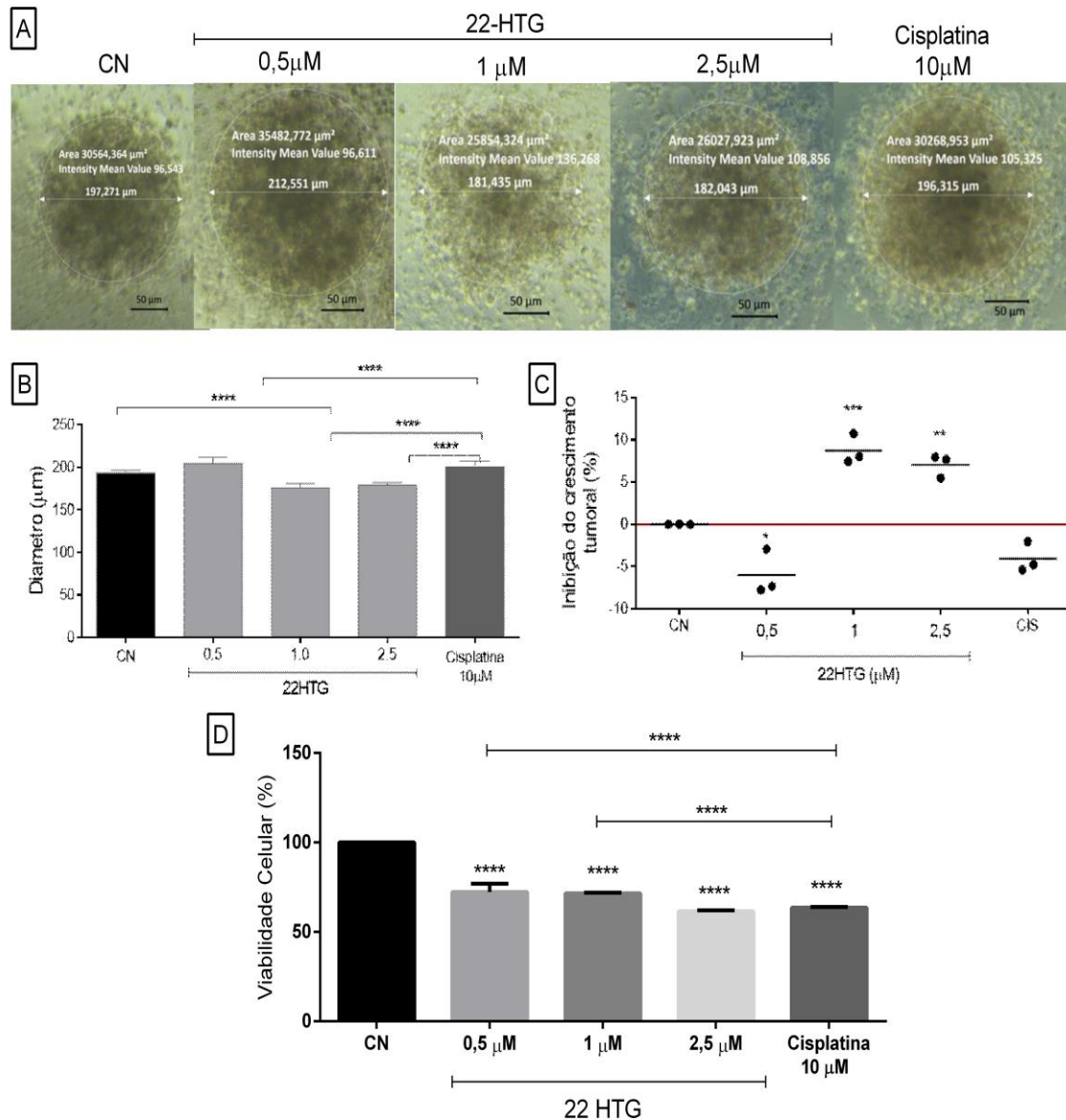


Figura 14: Comportamento dos esferoides de carcinoma de células escamosas (CAL27) frente ao tratamento com 22-HTG. A: Imagens representativas dos esferoides tratados com 22-HTG; B: Diâmetro dos esferoides após tratamento com 22-HTG; C: Percentual de inibição do crescimento tumoral dos esferoides tratados com 22-HTG comparado ao controle negativo; D: Porcentagem de viabilidade celular da CAL27 após tratamento de 48 horas com 22-HTG e cisplatina (10  $\mu\text{M}$ ). Valor de p: (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ . Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Os resultados do ensaio de viabilidade celular em modelo de esferoide, apontam o potencial citotóxico da 22-HTG frente as linhagens de carcinoma de células escamosas em modelo 3D, reforçando que mais estudos com essa substância são necessários a fim de elucidar seu potencial citotóxico. Em todas as concentrações de

22-HTG testadas, a viabilidade ainda ficou acima de 50%, maior que no modelo em monocamada, reforçando assim a influência do ambiente 3D na resposta celular.

Em modelo 2D, a 22-HTG apresentou CI50% de  $3,014 \pm 1,8$ - $3,3 \mu\text{M}$  frente a linhagem de CAL27 após 48 de cultivo. Em 72 horas, o potencial citotóxico da 22-HTG aumenta com valor de CI50% igual a  $1,698 \pm 1,5$ - $1,9 \mu\text{M}$ . Em estudo que avaliou a atividade citotóxica da 22-HTG em um painel de 13 diferentes linhagens celulares cultivadas em monocamada, frente a linhagem de CAL27, a 22-HTG apresentou CI50% igual a  $1,26 \pm 0,86$ - $1,76 \mu\text{M}$ . Nesse mesmo estudo, em MRC5 a 22-HTG apresentou CI50% igual a  $2,82 \pm 2,36$ - $3,37 \mu\text{M}$  após 72 horas de tratamento (RODRIGUES et al., 2021).

No modelo tridimensional de cultivo de células em esferoide de CAL27, a atividade citotóxica da 22-HTG reduziu em comparação ao modelo em monocamada, com viabilidade celular em torno de 61,6% após 48 horas de exposição a 22-HTG na concentração de  $2,5 \mu\text{M}$ . Esses resultados confirmam que o microambiente tridimensional (3D) dos esferoides tumorais pode ter uma influência significativa na resposta ao tratamento com substâncias citotóxicas em modelos de câncer. Ao contrário das células cancerosas cultivadas em placas de cultura bidimensionais, os esferoides tumorais formam uma estrutura tridimensional que proporciona um ambiente mais semelhante ao encontrado nos tumores reais.

Aranha et al. (2021), em estudo que avaliou a atividade da 22-HTG na invasão e supressão de células de melanoma, dados da citotoxicidade da substância foram apresentados em diferentes linhagens de células cultivadas em monocamada. Frente a linhagem de MRC5, a 22-HTG apresentou CI50 de  $2,61 \pm 2,29$ - $2,95 \mu\text{M}$  após 72 horas

de tratamento e frente a linhagem de melanoma humano (SK-MEL-28) CI50 de  $3,2 \pm 3,05 - 3,37 \mu\text{M}$ .

A utilização de modelos de esferoides tumorais proporciona um ambiente mais fisiologicamente relevante, onde as células tumorais podem interagir e se comportar de maneira semelhante ao que ocorre in vivo. Isso pode resultar em respostas mais precisas e previsíveis quanto à eficácia e toxicidade de substâncias em potencial (LEE; KIM, 2021; ZANONI et al., 2019, 2020).

## 5.6 Análise do centro necrótico

Um esferoide pode ser dividido em três zonas, nomeadamente, a zona necrótica no interior, a zona quiescente no meio e a zona proliferativa no exterior. Células mortas (zonas quiescentes e necróticas) podem ser resultantes da falta de nutrição e oxigénio no interior, enquanto a proliferação celular externa é realizada na superfície do esferoide (NATH; DEVI, 2016). A marcação com Acridina Orange e Brometo de Etídio foi utilizada para visualizar o núcleo necrótico e células viáveis dos esferoides.

Na figura 15 é possível observar a marcação das células viáveis em verde com a Acridina Orange e o núcleo necrótico com a marcação em vermelho com Brometo de Etideo, evidenciando a formação de centro com hipóxia em ambas as condições de densidades iniciais de células testadas,  $50 \times 10^4$  e  $100 \times 10^4$  no modelo MicroTissues® 3D Petri Dish®. As células centrais dos esferoides perdem a viabilidade em função da dificuldade de acesso aos nutrientes e oxigênio. Devido à



natureza tridimensional dos esferoides, os gradientes de nutrientes, oxigênio e pH estabelecem-se ao longo do tempo, assemelhando-se melhor ao microambiente fisiológico dos tumores sólidos em que a distância dos vasos sanguíneos dá origem a estes (BRÜNINGK; RIVENS, 2020).

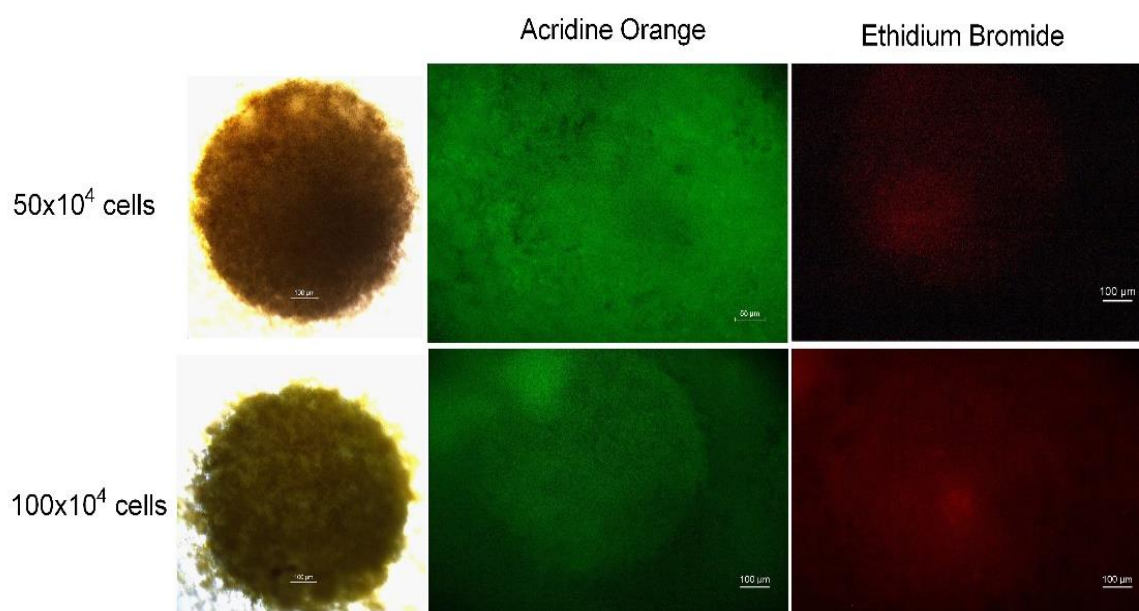


Figura 15: Imagens representativas de microscopia de fluorescência de esferoides gerados com o modelo MicroTissues® 3D Petri Dish® nas densidades iniciais de células de 50x10<sup>4</sup> e 100x10<sup>4</sup> após 7 dias. A fluorescência verde indica a coloração com Acridine Orange nas células vivas e a fluorescência vermelha indica a coloração com Brometo de Etídio nas células mortas. As imagens foram adquiridas com o software de imagem NIS-Elements 4.30.01 (Nikon Instruments, Melville, NY). As barras de escala representam 50 e 100 μm.

Em pesquisas oncológicas, vários estudos mostraram que tumores cultivados em monocamada são sensíveis a vários agentes quimioterápicos, enquanto as mesmas células cultivadas em forma de esferoides são resistentes a eles. Por outro lado, alguns medicamentos só são eficazes em ambiente 3D. O modelo de esferoides é particularmente vantajoso para a pesquisa do câncer devido à semelhança com nódulos tumorais não vascularizados, apresentando hipóxia central e diferentes

regiões de cultivo. No entanto, é importante destacar que os esferoides podem desenvolver necrose central, o que exige atenção dos pesquisadores na condução dos experimentos (SAKALEM et al., 2021; VERJANS et al., 2018).

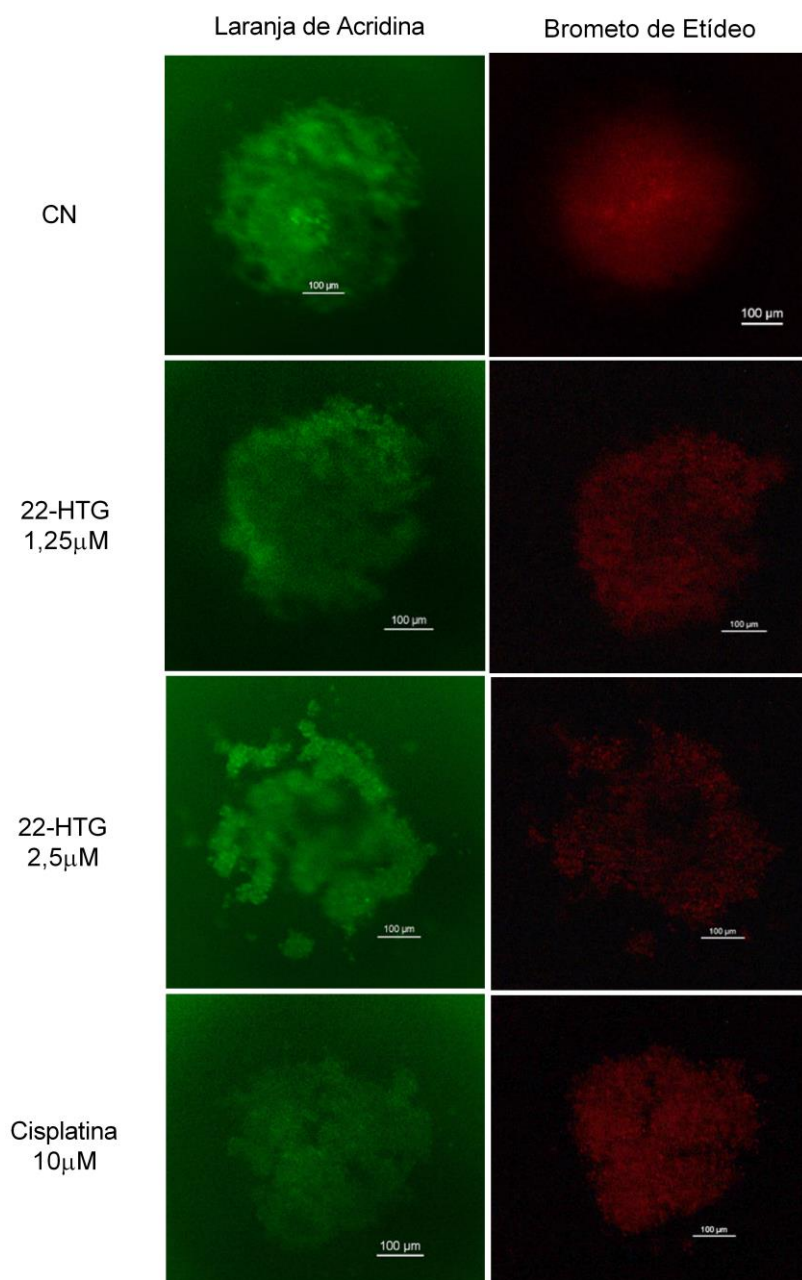


Figura 16: Imagens representativas de microscopia de fluorescência de esferoides gerados com o modelo MicroTissues® 3D tratados com 22-βhidroxitingenona (22HTG) nas concentrações 1,25 e 2,5 μM e Cisplatina na concentração de 10μM após 48 horas de tratamento. As barras de escala representam 100 μm.

O tratamento de 48 horas com 22- $\beta$ hidroxitingenona promoveu uma diminuição da marcação do centro necrótico e aumento da necrose em células da periferia do tumor, nas concentrações testadas 1,25 e 2,5  $\mu$ M. O mesmo efeito foi observado com a Cisplatina na concentração de 10  $\mu$ M. O efeito na desagregação das células dos esferoides foi observado quando tratados na concentração de 2,5  $\mu$ M, reforçando assim, o efeito da 22-  $\beta$ hidroxitingenona nas células da linhagem CAL27, mesmo em estrutura tridimensional de esferoide (Figura 16).

Estudos apontam que o efeito das substâncias no centro necrótico dos esferoides tumorais gerados *in vitro* pode variar dependendo da substância e das condições experimentais. O centro necrótico se forma nos esferoides tumorais devido à falta de nutrientes e oxigênio adequados no seu interior. Esse mesmo mecanismo ocorre nos tumores *in vivo*, entretanto, vias de angiogênese são ativadas para promover o aporte de oxigênio e sobrevivência das células tumorais (DÄSTER et al., 2017; SONG; NAJJAR; DILLER, 2014).

Alguns compostos quimioterápicos, como a doxorrubicina, podem causar a morte de células tumorais no centro necrótico, levando a um aumento da área necrótica. Outras substâncias, como agentes antiangiogênicos, como é o caso da cisplatina, podem inibir a formação de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, reduzir o suprimento de nutrientes para as células do centro necrótico, aumentando sua extensão. Além disso, algumas terapias dirigidas específicas podem ter como alvo vias metabólicas nas células tumorais, causando uma redução do metabolismo e, eventualmente, levando à morte celular no centro necrótico (KANTAPAN et al., 2022; ZHANG et al., 2020).

A cisplatina é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Seu mecanismo de ação envolve a formação de ligações covalentes com o DNA das células cancerígenas, levando a danos no material genético e à morte celular. A cisplatina é conhecida por ter uma preferência por células proliferativas, ou seja, células que estão se dividindo ativamente (ALDOSSARY, 2019; FUERTES et al., 2003). Uma vez que o centro necrótico em esferoides tumorais *in vitro* é composto principalmente por células que estão em um ambiente de hipóxia e baixa proliferação, é possível que a resposta à cisplatina seja limitada nessa região (KANTAPAN et al., 2022).

No entanto, estudos mostraram que a cisplatina pode penetrar no centro necrótico e causar a morte celular nas células que ainda estão viáveis ou que estão na periferia dessa área (ONO et al., 2022). Esse efeito foi observado ao tratar os esferoides com cisplatina 10 $\mu$ M, onde observou-se o aumento da necrose nas células da periferia do tumor. Além disso, a cisplatina também pode afetar indiretamente o centro necrótico por meio de seu efeito nas células adjacentes, como a inibição do crescimento de vasos sanguíneos que fornecem nutrientes ao tumor (CLOSE; JOHNSTON, 2022; FUERTES et al., 2003).

Em resumo, embora o centro necrótico possa ser menos sensível à cisplatina devido às suas características de hipóxia e baixa proliferação, ainda pode haver algum impacto nas células viáveis próximas ao centro necrótico e nos mecanismos adjacentes ao tumor. No entanto, a resposta específica dependerá das características do tumor, da dose da substância e do ambiente experimental em questão (DÄSTER et al., 2017; FUERTES et al., 2003).

Frente a linhagem de melanoma humano (SKMEL-28), a 22- $\beta$ hidroxitingenona reduziu a proliferação celular, migração e invasão das células em modelo de monocamada (ARANHA et al., 2020, 2021). Em modelo tridimensional de cultura celular, bem como, frente a linhagem CAL27, a 22- $\beta$ hidroxitingenona não havia sido estudada, sendo importante a contribuição dos resultados obtidos nessa tese. No entanto, é importante ressaltar que a resposta das células tumorais e o efeito das substâncias em geral, podem variar dependendo do tipo de tumor, da linhagem celular utilizada, das doses administradas e das condições experimentais. Portanto, estudos específicos são necessários para avaliar o efeito da 22- $\beta$ hidroxitingenona no centro necrótico dos esferoides tumorais gerados *in vitro*.

### **5.7 Estabelecimento dos modelos 3D com carcinoma de células escamosas**

Os tecidos de carcinoma de células escamosas (CCE-*Skin*) foram constituídos com linhagem celular de CAL-27 ( $15 \times 10^4$  células por pele) plaqueadas juntamente com os queratinócitos da matriz epidérmica, sobre os fibroblastos da matriz dérmica embebidos em colágeno tipo I, mantidos por 10 dias de cultivo. Os cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina apresentaram duas camadas principais, uma superior constituída de células com núcleo e citoplasma bem definidos e dispostos de forma contínua sobre a matriz dérmica e alguns pontos de invasão de agregados celulares, que ainda serão marcadas por imuno-histoquímica a fim de determinar qual a linhagem responsável por esse efeito. A camada inferior da matriz dérmica apresentou células com núcleos bem corados distribuídas sobre a matriz de colágeno tipo I bem definido (Figura 17).

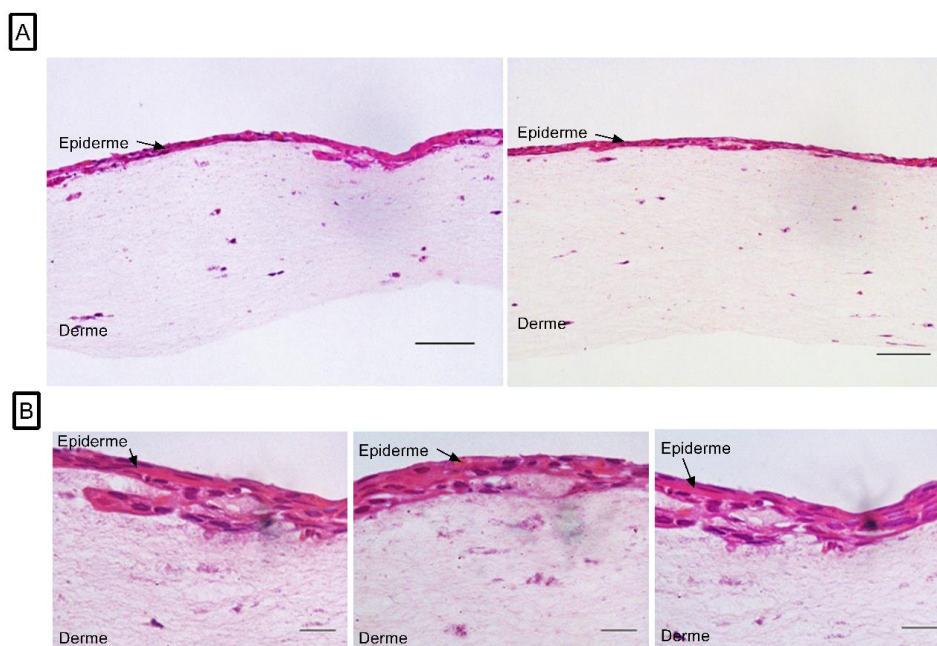


Figura 17: Cortes histológicas da pele humana reconstruída com linhagem celular de carcinoma de células escamosas (CCE-Skin) cultivadas no período de 10 dias coradas com Hematoxilina e Eosina. As peles com carcinoma de células escamosas apresentaram camadas contínuas de células bem marcadas na epiderme e células no tecido conjuntivo da derme. A – Aumento 20x; B – Aumento 100x.

No modelo CCE-InSitu, os esferoides implantados na pele podem ser vistos sem o auxílio do microscópio, como mostrado na Figura 18, o que facilita muitas vezes até a manipulação, uma vez que pode ser confirmada previamente a implantação dos esferoides no momento da manipulação em bancada. Com o auxílio do microscópio, os esferoides do modelo CCE-InSitu apresentaram diâmetro médio de  $234,52 \pm 34 \mu\text{m}$ .

O carcinoma *in situ* é um estágio inicial de câncer no qual as células cancerosas estão presentes apenas no local onde se originaram e não invadiram tecidos adjacentes. "*In situ*" é uma expressão em latim que significa "no local" ou "no lugar". Uma das características do carcinoma *in situ* é que as células cancerosas mantêm sua arquitetura e estrutura normais, sem invadir os tecidos vizinhos ou vasos sanguíneos. No entanto, as células têm o potencial de se tornar invasivas e se

espalhar se não forem tratadas (AASI & HONG, 2023; ALAM; RATNER, 2001; WALDMAN; SCHMULTS, 2019).

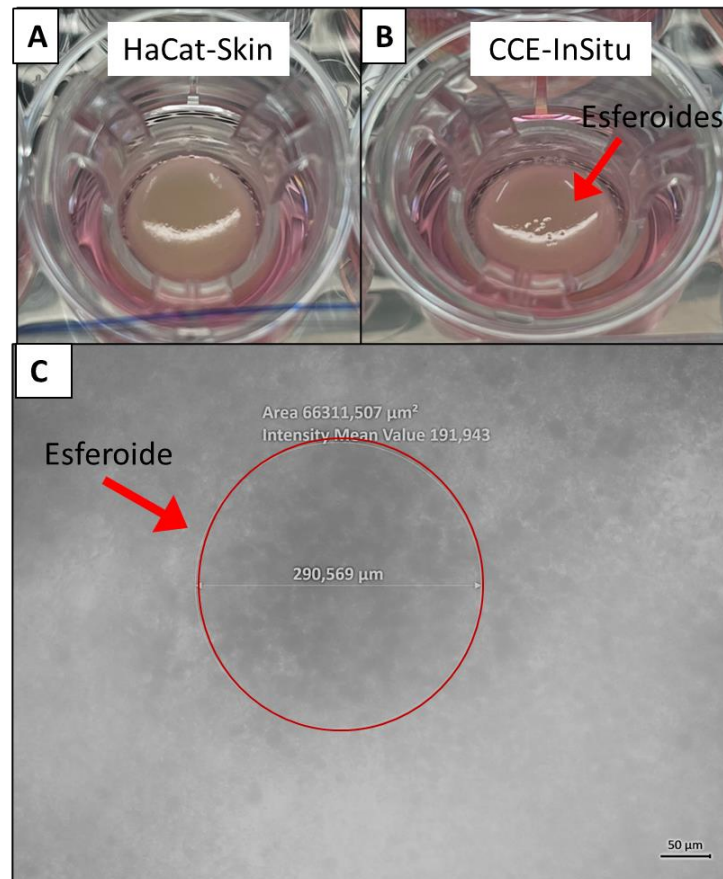


Figura 18: Peles humanas reconstruídas HaCat Skin (A) e CCE *InSitu* (B) visualizadas sem o auxílio do microscópio e visualização dos esferoides do modelo CCE *InSitu* em microscópio óptico (C), aumento 10X. Barra de escala: 50 μm.

Os modelos experimentais que utilizam células tumorais ou células normais modificadas para adquirir características de carcinoma *in situ in vitro*, como o modelo desenvolvido nessa tese, desempenham um papel crucial na mimetização do carcinoma *in situ* e são ferramentas valiosas para a pesquisa e compreensão dessa condição pré-invasiva do câncer. Esses modelos permitem o estudo detalhado da biologia do carcinoma, fornecendo informações sobre as alterações moleculares, sinalização celular e comportamento das células cancerosas antes da invasão dos

tecidos adjacentes, pesquisa de novos tratamentos, biomarcadores, e são alternativas éticas e promissoras aos estudos em animais, permitindo a realização de experimentos mais controlados e repetitivos, diminuindo a necessidade de testes invasivos em animais (BRAUCHLE et al., 2013; BROCK et al., 2019; POENICK et al., 2014).

### **5.8 Viabilidade celular nos modelos HaCat-Skin, CCE-Skin e CCEinsitu**

O tratamento de 48h com 22-βhidrotingenona (2,5 μM) promoveu uma redução de 86,1% da viabilidade celular no modelo HaCat-Skin contra 56% de redução no modelo CCE-Skin e 45% comparado ao modelo CCE-InSitu, evidenciando a citotoxicidade do composto nos dois modelos, sendo maior a citotoxicidade no modelo sem as células tumorais (Figura 19).

A toxicidade de substâncias pode variar dependendo do modelo experimental utilizado para avaliá-la. Geralmente, os modelos não tumorais (ou modelos saudáveis) tendem a apresentar maior sensibilidade à toxicidade de certas substâncias em comparação aos modelos tumorais. Fatores como taxa de proliferação celular, metabolismo celular, heterogeneidade celular e microambiente tumoral devem ser observados ao estudar a toxicidade de novas substâncias com potencial biológico (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; NUNES et al., 2019).

Modelos tumorais são caracterizados por uma rápida proliferação celular, o que pode afetar sua resposta à toxicidade de substâncias. As células tumorais frequentemente apresentam resistência a danos celulares e podem ser menos suscetíveis a certos agentes tóxicos em comparação às células normais, que



geralmente possuem uma taxa de proliferação mais lenta (KOROKNAI et al., 2020; NIERO et al., 2014).

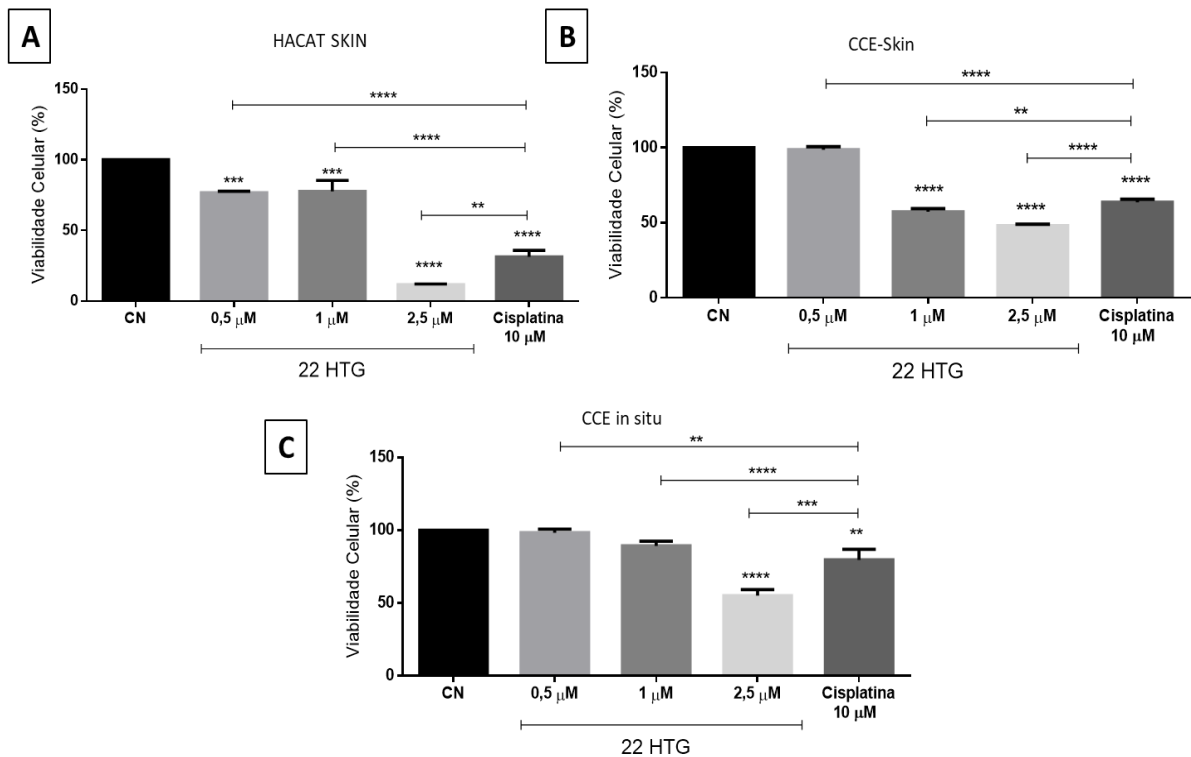


Figura 19: Viabilidade celular das peles humanas reconstruídas *in vitro* não tratadas e tratadas com 22-HTG após 48 horas de tratamento. A: Hacat-Skin; B: CCE-Skin e C: CCE *In situ*. Valor de p: (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

Além disso, tumores geralmente apresentam uma população heterogênea de células, com diferentes características genéticas e fenotípicas. Essa heterogeneidade pode resultar em diferentes respostas à toxicidade de substâncias dentro do tumor. Enquanto algumas células tumorais podem ser altamente sensíveis a uma substância, outras podem ser resistentes, diminuindo a toxicidade geral observada no modelo tumoral. O microambiente em que as células tumorais estão inseridas também pode influenciar a resposta à toxicidade de substâncias. Fatores como a disponibilidade de nutrientes, a presença de células imunes e a vascularização do tumor podem modular

a resposta das células tumorais à exposição a agentes tóxicos (DÄSTER et al., 2017; GREEN; YAMADA, 2007; MBEUNKUI; JOHANN, 2009; NOWACKA et al., 2021).

No entanto, é importante ressaltar que a toxicidade observada em modelos não tumorais não necessariamente se traduzirá em toxicidade em seres humanos ou em modelos tumorais. Cada modelo experimental tem suas limitações e é necessário considerar vários fatores ao avaliar a toxicidade de substâncias, incluindo a relevância biológica e a aplicação clínica dos resultados (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; PEDROSA; CATARINO; PENNACCHI, 2017).

### **5.9 Avaliação da atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz por zimografia em gel**

Afim de determinar a aplicação dos modelos para avaliação da atividade proteolítica de metaloproteinases 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), alíquotas dos meios de cultivo dos tecidos foram coletadas após 1, 7 e 10 dias. Os resultados apresentados na figura 20 apontam a presença de atividade proteolítica das metaloproteinases de matriz 2 e 9 nos modelos *HaCat-Skin*, *CCE-Skin* e *CCEInSitu*, principalmente nos últimos dias de cultivo (7 e 10 dias), o que permite afirmar a aplicabilidade do modelo para este ensaio de invasão celular quando testadas as substâncias futuramente.

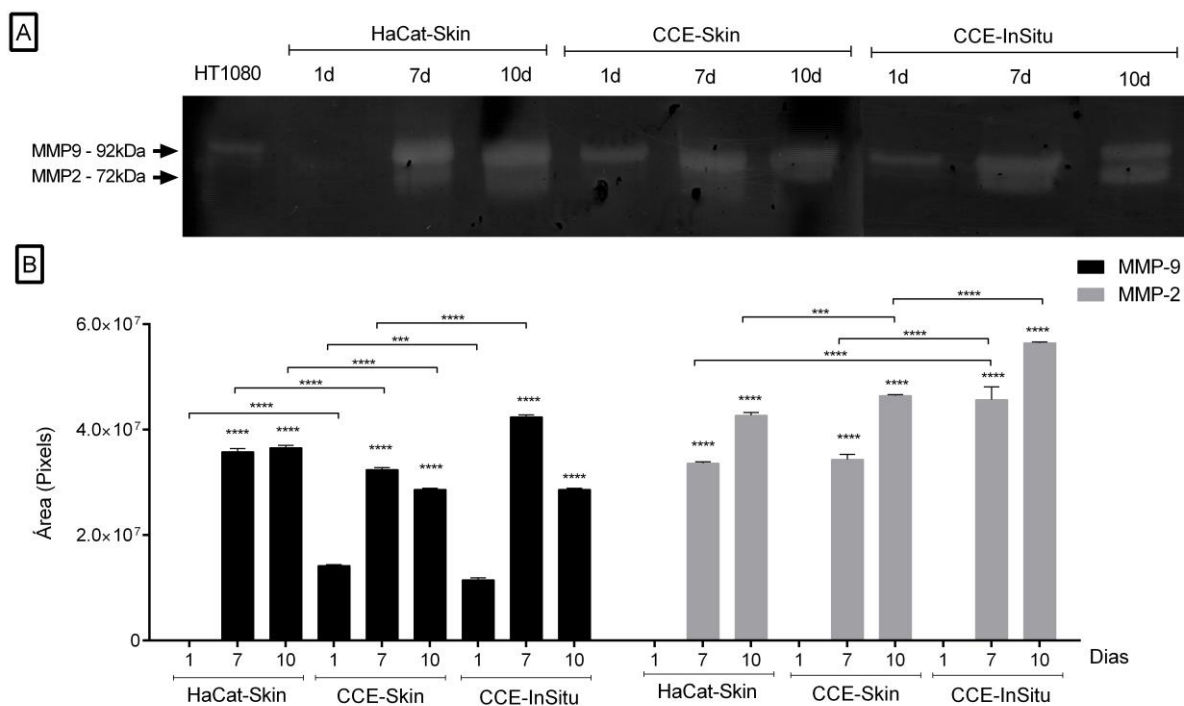


Figura 20: Atividade de metaloproteinasas 2 e 9 em sobrenadante de peles humanas reconstruídas sem célula tumoral (HaCat-Skin) e tumoral com carcinoma de células escamosas (CCE-Skin) após 1, 7 e 10 dias de cultivo.

As metaloproteinasas de matriz (MMPs) são enzimas que desempenham um papel importante na remodelação da matriz extracelular (MEC) durante processos fisiológicos e patológicos. Elas estão envolvidas em várias funções celulares, incluindo migração, proliferação, adesão e sinalização celular. Quando se trata de estudar as MMPs em um modelo tridimensional de cultura celular, é possível investigar sua atividade e função em condições que mais se assemelham ao ambiente *in vivo*. A vantagem desse método é a utilização do meio sobrenadante de cultivo dos tecidos, otimizando assim os modelos (MARTINEZ-GARCIA et al., 2022; SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005).

### 5.10 Zimografia *in situ*

As metaloproteinases (MMPs), também conhecidas como metaloproteinases da matriz, são uma família de enzimas envolvidas na remodelação e degradação da matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede complexa de moléculas, como colágeno, elastina e proteoglicanos, que fornecem suporte estrutural e funcional aos tecidos. Essas enzimas desempenham um papel fundamental na regulação da matriz extracelular, permitindo a remodelação adequada durante processos fisiológicos, como crescimento e desenvolvimento, cicatrização de feridas e resposta imune. No entanto, quando desreguladas, essas enzimas também estão associadas a diversas doenças, incluindo câncer, doenças inflamatórias e doenças do tecido conectivo (HU; BEETON, 2010; MARTINEZ-GARCIA et al., 2022; SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005).

No ensaio de zimografia *in situ*, após tratamento de 48 horas da 22-HTG em modelo de pele humana reconstruída com esferoides de CAL27, CCE-InSitu, observou-se pontos de fluorescência verde em várias partes do tecido e a intensidade de fluorescência mensurada, apresentou redução com o tratamento da 22-HTG na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , comparado ao controle negativo. Esses resultados reforçam uma possível inibição de metaloproteinases por ação da 22-HTG nessa concentração (Figura 21). Entretanto, é importante ressaltar que o DQ™ Gelatin é um substrato específico para as MMPs, mas é sensível a outras enzimas que também podem clivar a gelatina. Portanto, é necessário considerar cuidadosamente a especificidade e o controle experimental adequado ao realizar a avaliação das MMPs usando essa técnica (FREDERIKS; MOOK, 2004).

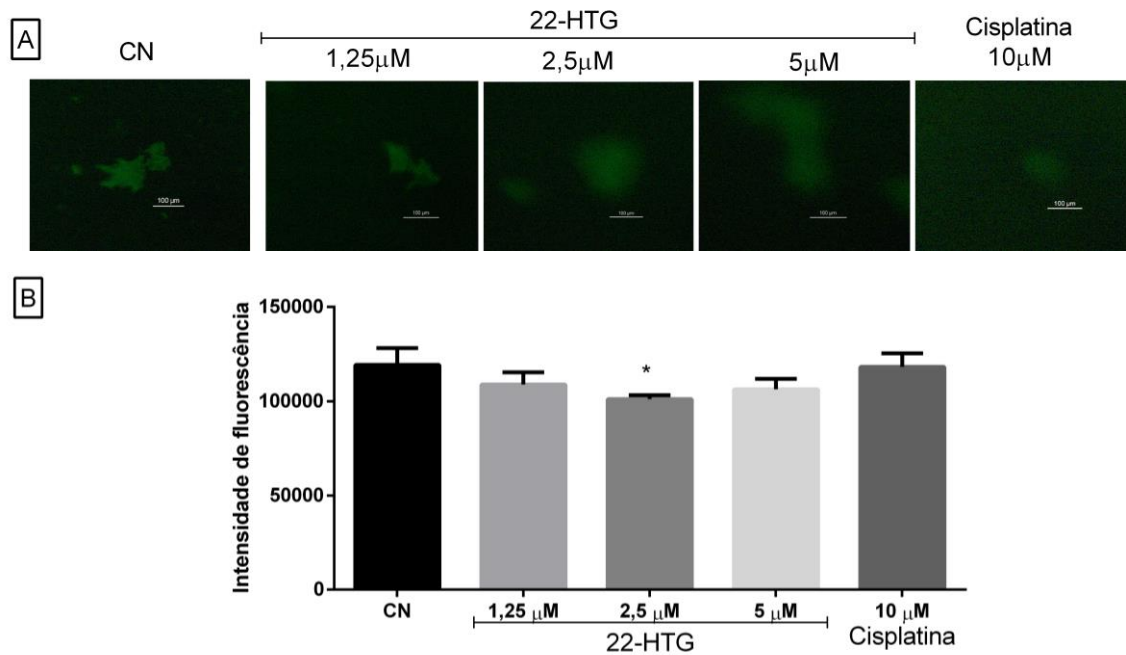


Figura 21: Zimografia *in situ* em modelo de pele humana reconstruída com esferoides de carcinoma de células escamosas (CCE *In situ*) tratados com 22-βhidroxitingenona (22-HTG) após 48 horas. A fluorescência na cor verde devido à atividade gelatinolítica foi encontrada na matriz extracelular dos tumores na pele. A: Imagens capturadas com fluorescência. Barra de escalas: 100 μm. B: Análise quantitativa da fluorescência na zimografia *in situ*.

Na zimografia *in situ* com gelatina DQ, a fluorescência verde ocorre devido à clivagem da gelatina DQ por atividade gelatinolítica presente no tecido. A gelatina DQ é um substrato fluorogênico que emite fluorescência quando é clivado por enzimas gelatinolíticas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs). Quando a gelatina DQ é aplicada em uma seção de tecido ou em uma preparação de células, as enzimas gelatinolíticas ativas no tecido irão clivar a gelatina DQ, resultando na liberação de fragmentos de gelatina marcados com uma molécula que emite fluorescência verde (FREDERIKS; MOOK, 2004; MOOK et al., 2003).

Os fragmentos de gelatina clivados, que estão ligados à molécula fluorescente, se acumulam nos locais de atividade gelatinolítica no tecido, gerando pontos de fluorescência verde visíveis sob um microscópio de fluorescência. Portanto, a

fluorescência verde observada na zimografia *in situ* com gelatina DQ indica a presença de atividade gelatinolítica no tecido analisado. Essa técnica é especialmente útil para estudar a atividade das MMPs e outras enzimas que clivam a gelatina na matriz extracelular e nos tecidos (GEORGE; & JOHNSON, 2010; HADLER-OLSEN et al., 2010).

A análise da atividade das MMPs usando DQ™ Gelatin pode fornecer informações sobre o perfil de expressão e atividade dessas enzimas na pele. Isso é relevante para compreender os processos de remodelação da matriz extracelular na pele normal e em condições patológicas, permitindo o estudo de mecanismos envolvidos em processos como cicatrização, envelhecimento cutâneo e doenças dermatológicas (FREDERIKS; MOOK, 2004; HU; BEETON, 2010; MOOK et al., 2003; VANDOOREN et al., 2013).

## 6 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível estabelecer um modelo de carcinoma *in situ* com linhagens de células escamosas em pele humana equivalente *in vitro* para aplicação de testes biológicos. Foram realizados experimentos para o desenvolvimento de três microambientes celulares, pele sem células tumorais (HaCat-Skin), pele com carcinoma de células escamosas (CCE-Skin) e pele com esferoides de carcinoma de células escamosas (CCE *In situ*).

O modelo HaCat Skin conseguiu diferenciar as substâncias com potencial de irritação cutânea, indicado por redução da viabilidade celular, bem como, permear a cafeína de forma que foi possível dosá-la no meio receptor. Esses resultados obtidos foram fundamentais para contribuir com métodos alternativos ao uso de animais em experimentação para estudo da irritação cutânea, bem como, permeação, e entender o comportamento das substâncias e sua interação com a pele humana em um ambiente controlado nas condições do modelo desenvolvidas neste trabalho, permitindo assim, o estabelecimento de parâmetros que norteiem experimentos e avaliações futuras sobre a segurança de produtos farmacêuticos e similares que venham a ser testados nas mesmas condições.

Outro aspecto importante deste trabalho foi a análise do efeito de substâncias citotóxicas sobre as células tumorais presentes no microambiente tridimensional do carcinoma de células escamosas *in vitro*. Essa análise permitiu avaliar a eficácia da 22-βhidroxitingenona na inibição do crescimento e proliferação das células tumorais em modelo 3D de cultura de células, fornecendo informações valiosas para o estudo dessa substância.

A presença de atividade proteolítica das metaloproteinases de matriz 2 e 9 nos modelos HaCat-Skin, CCE-Skin e CCE *In situ* contribui com uma metodologia que pode ser utilizada para ensaios de avaliação da invasão tumoral através dos modelos de carcinoma de células escamosas *in vitro*, contribuindo assim, no entendimento dos mecanismos de invasão das células tumorais e na identificação de potenciais alvos terapêuticos para inibir ou prevenir a disseminação do carcinoma de células escamosas.

Em suma, este estudo proporcionou uma compreensão mais aprofundada do modelo de carcinoma de células escamosas em pele humana equivalente *in vitro* e seus aspectos morfológicos, estruturais e funcionais. Os resultados obtidos são relevantes para o avanço da pesquisa nas áreas de cultura 3D e podem contribuir para o desenvolvimento de novos modelos para o estudo câncer, principalmente do carcinoma *in situ*. Nesse sentido, os resultados dessa tese podem ser utilizados como base para o desenvolvimento de outros modelos de carcinoma *in situ* com outras linhagens celulares.

Vale ressaltar que mais estudos devem ser realizados para validar os modelos, a fim, de que possam ser utilizados com segurança e alta reprodutibilidade pelos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento. Além disso, uma vez com o modelo base desenvolvido, vários outros estudos de aplicabilidade podem ser realizados, incluindo desenvolvimento de modelos mais complexos com outros tipos de células, estudos de biomarcadores, estudos de progressão e invasão do câncer e outras doenças.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASI, S. Z; HONG, A. M.. Treatment and prognosis of cutaneous squamous cell carcinoma. UpToDate, 2023. Disponível em: <[https://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prognosis-of-cutaneous-squamous-cell-carcinoma/print?source=related\\_link](https://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prognosis-of-cutaneous-squamous-cell-carcinoma/print?source=related_link)>. Acesso em: 203 set. 2023.

ABDEL-NASER, M. B. et al. Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. Egyptian Dermatology Online Journal, v. 1, n. 2, p. 1–25, 2005.

ALAM, M. et al. Guidelines of care for the management of cutaneous squamous cell carcinoma. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 78, n. 3, p. 560–578, 2018.

ALAM, M. D. M.; RATNER, M. D. D. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. N Engl J Med, v. 344, n. 13, p. 975–983, 2001.

ALDOSSARY, S. A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. Biomedical and Pharmacology Journal, v. 12, n. 1, p. 07–15, 28 mar. 2019.

ALLER, M. A. et al. Posttraumatic Inflammation Is a Complex Response Based on the Pathological Expression of the Nervous, Immune, and Endocrine Functional Systems. Experimental Biology and Medicine, v. 229, n. 2, p. 170–181, 2004.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. Current Biology, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 17 ago. 2020.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2BrasíliaAgência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

ARANHA, E. S. P. Efeito antitumoral de 22beta-hidroxitigenona obtida de *Salacia impressifolia* (MIERS) A. C. (CELASTRACEAE) contra células de melanoma humano. Tese de doutorado—[s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2020.

ARANHA, E. S. P. et al. 22 $\beta$ -hydroxytingenone reduces proliferation and invasion of human melanoma cells. Toxicology in Vitro, v. 66, 1 ago. 2020.

ARANHA, E. S. P. et al. 22 $\beta$ -hydroxytingenone induces apoptosis and suppresses invasiveness of melanoma cells by inhibiting MMP-9 activity and MAPK signaling. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 267, 1 mar. 2021.

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

BAGHBAN, R. et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2020.

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T. R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. *Burns*, v. 27, p. 534–544, 2001.

BATTISTA, S. et al. The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation. *Biomaterials*, v. 26, n. 31, p. 6194–6207, 2005.

BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 18 ago. 2018.

BOELSMA, E. et al. Characterization and Comparison of Reconstructed Skin Models : Morphological and Immunohistochemical Evaluation. *Acta Derm Venereol*, v. 80, n. July, p. 82–88, 2000.

BRASIL. Resolução Normativa N<sup>o</sup> 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa n<sup>o</sup> 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-18-de-24-de-setembro-de-2014.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BRASIL. Resolução Normativa N<sup>o</sup> 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-31-de-18-de-agosto-de-2016.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BRASIL. Resolução N<sup>o</sup> 45, de 22 de outubro de 2019 - Reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Disponível em:

<<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-45-de-22-de-outubro-de-2019-223849135>>.

Acesso em: 10 jun. 2023.

BRASIL. Resolução Normativa CONCEA Nº 54, de 10 de janeiro de 2022. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica e dá outras providências. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-normativa-concea-n-54-de-10-de-janeiro-de-2022-374148642>>. Acesso em: 10 jun. 2023a.

BRASIL. Resolução Nº 56, de 5 de outubro de 2022. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-56-de-5-de-outubro-de-2022-434544861>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BRASIL. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BRASIL. Resolução Nº 58, de 24 de fevereiro de 2023 - Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-58-de-24-de-fevereiro-de-2023-466792333>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BRAUCHLE, E. et al. Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system. *Biomaterials*, v. 34, n. 30, p. 7401–7407, 2013.

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal : uma revisão de literatura entre o perfil do paciente , estadiamento clínico e tratamento proposto. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 1, p. 63–69, 2007.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, mar. 2013.

BROCK, E. J. et al. In Vitro Models for Studying Invasive Transitions of Ductal Carcinoma In Situ. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 24, n. 1, p. 1–15, 28 mar. 2019.

- BROHEM, C. A. et al. Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. *Pigment Cell Melanoma Res.*, v. 24, n. 1, p. 35–50, 2011.
- BRÜNINGK, S. C.; RIVENS, I. 3D tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1653, 2020.
- CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 4, p. 328–340, abr. 2005.
- CHAMOLI, A. et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncology*, v. 121, 1 out. 2021.
- CHORILLI, M.; SCARPA, M. V. Toxicologia dos Cosméticos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 1, p. 144–54, 2007.
- CLOSE, D. A.; JOHNSTON, P. A. Detection and impact of hypoxic regions in multicellular tumor spheroid cultures formed by head and neck squamous cell carcinoma cells lines. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, v. 27, n. 1, p. 39–54, 1 jan. 2022.
- CLOWES, H. M.; SCOTT, R. C.; HEYLINGS, J. R. Skin absorption: Flow-through or static diffusion cells. *Toxicology in Vitro*, v. 8, n. 4, p. 827–830, ago. 1994.
- COLLEY, H. E. et al. Development of tissue-engineered models of oral dysplasia and early invasive oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, v. 105, n. 10, p. 1582–1592, 2011.
- CONCEA. Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica - DBCA. Disponível em: <[http://nharvey.icb.usp.br/corpoeditorial/ARQUIVOS/etica-animal/RESOLUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_30\\_DE\\_02\\_02\\_2016.pdf](http://nharvey.icb.usp.br/corpoeditorial/ARQUIVOS/etica-animal/RESOLUCAO_NORMATIVA_N_30_DE_02_02_2016.pdf)>. Acesso em: 18 jan. 2017.
- BRASIL. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Disponível em: <[https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-concea/guia\\_concea\\_1ed\\_animais-\\_ensino\\_ou\\_pesquisa\\_2023.pdf](https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-concea/guia_concea_1ed_animais-_ensino_ou_pesquisa_2023.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2023.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology*, v. 39, n. sup1, p. 8–17, 10 jan. 2001.

CUI, X.; HARTANTO, Y.; ZHANG, H. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 14, n. 127, 1 fev. 2017.

DA SILVA, F. M. A. et al. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 68, p. 77–80, 1 out. 2016.

DAHL, E. L. et al. The reconstructed skin micronucleus assay (RSMN) in EpiDerm™: Detailed protocol and harmonized scoring atlas. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 720, n. 1–2, p. 42–52, 2011.

DÄSTER, S. et al. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment *Oncotarget*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget>>. Acesso em: 14 abr. 2023.

DESHMUKH, G. R. et al. Toxicology in Vitro In vitro skin corrosion: Human skin model test – A validation study. *Toxicology in Vitro*, v. 26, n. 6, p. 1072–1074, 2012.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223–229, 2015.

DONOVAN, J. Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell Carcinoma. *Dermatologic Surgery*, v. 35, n. 9, p. 1311–1323, 2009.

FENNEMA, E. et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 108–115, fev. 2013.

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

FILAIRE, E. et al. Alternative in vitro models used in the main safety tests of cosmetic products and new challenges. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 44, n. 6, p. 604–613, 1 dez. 2022.

FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 64, n. 3, p. 190–195, mar. 1975.

FREDERIKS, W. M.; MOOK, O. R. F. Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on In Situ Zymography of Gelatinases. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 52, n. 6, p. 711–722, 26 jun. 2004.

- FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nature Protocols*, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.
- FUERTE, M. et al. Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Current Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 257–266, 1 fev. 2003.
- GABBOTT, C. M.; SUN, T. Comparison of human dermal fibroblasts and hacat cells cultured in medium with or without serum via a generic tissue engineering research platform. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 2, p. 388, 2018.
- GANGATIRKAR, P. et al. Establishment of 3D organotypic cultures using human neonatal epidermal cells. *Protocol Nature*, v. 2, n. 1, p. 178–186, 2007.
- GEORGE, S. J.; & JOHNSON, J. L. In Situ Zymography. Em: CLARK, I. M. (Ed.). *Matrix Metalloproteinase Protocols. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 622p. 271–277.
- GIBBS, S. et al. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 272, n. 2, p. 529–541, 2013.
- GLOGAU, R. G. The risk of progression to invasive disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 42, n. 1 SUPPL. 1, p. S23–S24, 2000.
- GODUGU, C. et al. AlgiMatrix™ Based 3D Cell Culture System as an In-Vitro Tumor Model for Anticancer Studies. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, 2013.
- GREEN, J. A.; YAMADA, K. M. Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 1293–1298, 2007.
- HADLER-OLSEN, E. et al. Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: Zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 58, n. 1, p. 29–39, jan. 2010.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HENSLER, S. et al. Establishment and initial characterization of a simple 3D wound healing model. *Current Directions in Biomedical Engineering*, v. 5, n. 1, p. 581–584, 2019.

- HU, X.; BEETON, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *Journal of Visualized Experiments*, n. 45, p. 1–4, 2010.
- HUBRECHT, R. C.; CARTER, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals*, v. 9, n. 10, p. 754, 25 fev. 2019.
- INCA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2020. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/livro\\_abc\\_6ed\\_0.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/livro_abc_6ed_0.pdf)> . Acesso em: 18 fev. 2023.
- ISHIGURO, T. et al. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Science*, v. 108, n. 3, p. 283–289, 1 mar. 2017.
- IVANOV, D. P. et al. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, 13 ago. 2014.
- JACKSON, B. A. Skin cancer in skin of color. *Skin Cancer Management: A Practical Approach*, v. 21, n. 4, p. 217–223, 2010.
- KANDÁROVÁ, H. et al. An In Vitro Skin Irritation Test (SIT) using the EpiDerm Reconstructed Human Epidermal (RHE) Model. *Journal of Visualized Experiments*, v. 29, n. July, p. 1366, 2009.
- KANTAPAN, J. et al. Pentagalloyl Glucose and Cisplatin Combination Treatment Exhibits a Synergistic Anticancer Effect in 2D and 3D Models of Head and Neck Carcinoma. *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 7, 1 jul. 2022.
- KARIMKHANI, C. et al. It's time for “keratinocyte carcinoma” to replace the term “nonmelanoma skin cancer”. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 72, n. 1, p. 186–187, 2015.
- KEOHANE, S. G. et al. British Association of Dermatologists guidelines for the management of people with cutaneous squamous cell carcinoma 2020\*. *British Journal of Dermatology*, v. 184, n. 3, p. 401–414, 18 mar. 2021.
- KINSNER, A.; LESIAK-CYGANOWSKA, E.; SLADOWSKI, D. In vitro reconstruction of full thickness human skin on a composite collagen material. *Cell and Tissue Banking*, v. 2, p. 165–171, 2001.

- KOJIMA, H. et al. A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24. *Journal Applied Toxicology*, v. 34, p. 766–774, 2014.
- KOROKNAI, V. et al. Gene Expression Signature of BRAF Inhibitor Resistant Melanoma Spheroids. *Pathology and Oncology Research*, v. 26, n. 4, p. 2557–2566, 1 out. 2020.
- LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, v. 249, n. 1, p. 24–28, 1997.
- LEE, K. H.; KIM, T. H. Recent advances in multicellular tumor spheroid generation for drug screening. *BiosensorsMDPI*, 1 nov. 2021.
- LIM, Y. C. et al. Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, v. 47, n. 2, p. 83–91, 2011.
- LOEHRER, P. J. Cisplatin. *Annals of Internal Medicine*, v. 100, n. 5, p. 704, 1 maio 1984.
- LOW, Z. W. K. et al. Recent innovations in artificial skin. *Biomaterials Science*, v. 8, n. 3, p. 776–797, 20 fev. 2020.
- MAAS-SZABOWSKI, N.; STÄRKER, A.; FUSENIG, N. E. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- $\alpha$ . *Journal of Cell Science*, v. 116, n. 14, p. 2937–48, 2003.
- MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, v. 445, n. February, 2007.
- MAJOLO, F. et al. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*, v. 31, p. 196–207, 1 jun. 2019.
- MAMAN, S.; WITZ, I. P. A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 6, p. 359–376, 2018.
- MANUSCRIPT, A. Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. *Pigment Cell Melanoma Res.*, v. 24, n. 1, p. 35–50, 2012.
- MARSH, D. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *Journal of Pathology*, v. 223, p. 470–481, 2011.
- MARTIN, M. T.; VULIN, A.; HENDRY, J. H. Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. *Mutation Research*, v. 770, p. 349–368, 2016.



MARTINEZ-GARCIA, F. D. et al. Matrix Metalloproteases from Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Are Spatiotemporally Regulated by Hydrogel Mechanics in a 3D Microenvironment. *Bioengineering*, v. 9, n. 8, p. 340, 26 jul. 2022.

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

MCTI. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI. Portaria N° 491, de 3 de julho de 2012. *Diário Oficial da União* de 05/07/2012 (n° 129, Seção 1, pág. 19), 2012.

MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, v. 164, n. 2, p. 192–204, 10 dez. 2012.

MIGDEN, M. R. et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, p. 1–11, 2018.

MILLER, M. A. et al. Uptake and desorption of hydrophilic compounds from human stratum corneum. *Journal of Controlled Release*, v. 261, p. 307–317, 10 set. 2017.

MOOK, O. R. F. et al. In Situ Localization of Gelatinolytic Activity in the Extracellular Matrix of Metastases of Colon Cancer in Rat Liver Using Quenched Fluorogenic DQ-gelatin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 51, n. 6, p. 821–829, 26 jun. 2003.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Publishing Group*, v. 4, n. November, 2004.

MUSINI, A.; RAO, J. P.; GIRI, A. Phytochemicals of *Salacia oblonga* responsible for free radical scavenging and antiproliferative activity against breast cancer cell lines (MDA-MB-231). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 21, n. 4, p. 583–590, 4 out. 2015.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol Ther*, v. 163, p. 94–108, 2016.

NEHAL, K. S.; BICHAKJIAN, C. K. Update on Keratinocyte Carcinomas. *New England Journal of Medicine*, v. 379, n. 4, p. 363–374, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NIEHUES, H. et al. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Experimental Dermatology*, v. 27, n. 5, p. 501–511, 1 maio 2018.

NIERO, E. L. et al. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, p. 33–37, 2014.

NOWACKA, M. et al. Drug resistance evaluation in novel 3D in vitro model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 138, p. 111536, jun. 2021.

NUNES, A. S. et al. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and Bioengineering* John Wiley and Sons Inc., 1 jan. 2019.

OECD. Notes od guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation. Paris Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2000.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2015.

OECD TG 428. OECD Test Guideline for Skin Absorption: In vitro Method. Paris Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2004.

OECD TG 439. Guidelines for the testing of chemicals - In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method TG 439. Paris Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2015.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. DE A.; BATISTUZZO, J. A. DE O. Fundamentos de toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OH, J. W. et al. Organotypic skin culture. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 11, p. 1–4, 2013.

OMS. WHO Report on Cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240001299>>. Acesso em: 18 fev. 2023.

ONO, K. et al. Reproduction of the Antitumor Effect of Cisplatin and Cetuximab Using a Three-dimensional Spheroid Model in Oral Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, v. 19, n. 8, p. 1320–1333, 2022.

- ONU. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). New York and Geneva: Organização das Nações Unidas, 2013.
- OWENS, D. M.; WATT, F. M. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 6, p. 444–451, 2003.
- PADMAA PAARAKH, M. et al. Catharanthus Roseus Linn—A Review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 10, p. 19–24, 6 set. 2019.
- PADRÓN, J. M. et al. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 36, p. 141–157, 2000.
- PAGE, H.; FLOOD, P.; REYNAUD, E. G. Three-dimensional tissue cultures: Current trends and beyond. *Cell and Tissue Research*, v. 352, n. 1, p. 123–131, 2013.
- PAGEON, H. et al. Skin aging by glycation: lessons from the reconstructed skin model. *Clin Chem Lab Med*, v. 52, n. 1, p. 169–174, 2014.
- PEDROSA, N.; CATARINO, C. M.; PENNACCHI, P. C. Toxicology in Vitro A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. *Toxicology in Vitro*, v. 42, n. January, p. 31–37, 2017.
- PENNACCHI, P. C.; ARAU, M. C. DE; FAGUNDES, M. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. *Tissue Engineering: Part A*, v. 21, n. 17/18, p. 2417–2425, 2015.
- PFUHLER, S. et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Genotoxicity. A COLIPA analysis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 57, n. 2–3, p. 315–324, 2010.
- PODURI, R. *Drug Discovery and Development*. Singapore: Springer Singapore, 2021.
- POENICK, S. et al. Comparative label-free monitoring of immunotoxin efficacy in 2D and 3D mamma carcinoma in vitro models by impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 53, p. 370–376, 15 mar. 2014.
- PULSONI, I. et al. Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. *SLAS Technology*, v. 27, n. 3, p. 161–171, jun. 2022.

QUE, S. K. T.; ZWALD, F. O.; SCHMULTS, C. D. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 78, n. 2, p. 237–247, 2018.

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

REIJNDERS, C. M. A. et al. Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent in Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Engineering - Part A*, v. 21, n. 17–18, p. 2448–2459, 2015.

RIVERA, E. A. B. Ética na experimentação animal. *Revista de Patologia Tropical*, v. 30, n. 1, p. 9–14, 2001.

RODRIGUES, A. C. B. DA C. et al. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 231, p. 516–524, 1 mar. 2019.

RODRIGUES, A. C. B. DA C. et al. Tingenone and 22-hydroxytingenone target oxidative stress through downregulation of thioredoxin, leading to DNA double-strand break and JNK/p38-mediated apoptosis in acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 142, p. 112034, 1 out. 2021.

ROGUETE, R. et al. Use of a standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 22, p. 409–419, 2000.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Special Ed ed. Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1959.

SAHAYAM, S. C.; BRINDHA P; LOGAMANIAN M. ANTIOXIDANT AND ANTI DIABETIC POTENTIALS OF SALACIA SPECIES. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 85–87, 2014.

SAKALEM, M. E. et al. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnology Journal*, v. 16, n. 5, p. 2000463, 25 maio 2021.

SCHÄFER-KORTING, M. et al. Reconstructed human epidermis for skin absorption testing : Results of the German prevalidation study Reconstructed Human Epidermis for Skin

- Absorption Testing : Results of the German Prevalidation Study. Alternatives to laboratory animals: ATLA, v. 34, p. 283–294, 2006.
- SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. Cell, v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 3 dez. 2015.
- SHIMIZU, I. et al. Treatment of Squamous Cell Carcinoma In Situ: A Review. Dermatologic Surgery, v. 37, n. 10, p. 1349–1411, 2011.
- SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M. et al. Técnicas de zimografía para el análisis de metaloproteasas de matriz y sus inhibidores. BioTechniques, v. 38, n. 1, p. 73–83, 2005.
- SONG, A. S.; NAJJAR, A. M.; DILLER, K. R. Thermally induced apoptosis, necrosis, and heat shock protein expression in 3D culture. Journal of Biomechanical Engineering, v. 136, n. 7, 2014.
- SOUSA, L. B. DE. Desenvolvimento e aplicação de pele humana reconstruída in vitro para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade (Dissertação de mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, 2018.
- SPOERRI, L.; GUNASINGH, G.; HAASS, N. K. Fluorescence-Based Quantitative and Spatial Analysis of Tumour Spheroids: A Proposed Tool to Predict Patient-Specific Therapy Response. Frontiers in Digital Health, v. 3, 28 maio 2021.
- STOHS, S. J.; RAY, S. Anti-diabetic and Anti-hyperlipidemic Effects and Safety of *Salacia reticulata* and Related Species. Phytotherapy Research, v. 29, n. 7, p. 986–995, 31 jul. 2015.
- SUGIHARA, H. et al. Effects of fat cells on keratinocytes and fibroblasts in a reconstructed rat skin model using collagen gel matrix culture. British Journal of Dermatology, v. 144, n. 2, p. 244–253, fev. 2001.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.
- TOWNSEND, T. A. et al. The Development and Validation of EpiComet-Chip, a Modified High-Throughput Comet Assay for the Assessment of DNA Methylation Status. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 58, p. 508–521, 2017.
- TRENDOWSKI, M. Recent Advances in the Development of Antineoplastic Agents Derived from Natural Products. Drugs, v. 75, n. 17, p. 1993–2016, 26 nov. 2015.

- TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 19, n. 2, p. 106–121, maio 2006.
- VAN DE SANDT, J. J. M. et al. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: A multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 39, n. 3, p. 271–281, jun. 2004.
- VAN NORMAN, G. A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials. *JACC: Basic to Translational Science*, v. 4, n. 7, p. 845–854, 1 nov. 2019.
- VAN NORMAN, G. A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials. *JACC: Basic to Translational Science*, v. 5, n. 4, p. 387–397, 1 abr. 2020.
- VANDOOREN, J. et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*, v. 10, n. 3, p. 211–220, 2013.
- VERJANS, E. T. et al. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *Journal of Cellular Physiology* Wiley-Liss Inc., 1 abr. 2018.
- VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Alternative Methods for Eye and Skin Irritation Tests: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 1, p. 46–59, 2008.
- WALDMAN, A.; SCHMULTS, C. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 1–12, 2019.
- WESTERS-ATTEMA, A. et al. Correlation between histological findings on punch biopsy specimens and subsequent excision specimens in cutaneous squamous cell carcinoma. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 95, n. 2, p. 181–185, 2015.
- WEVER, B. DE et al. Based Engineered Human Tissue Models: A New Gold Standard for Nonanimal Testing Through. *Applied in vitro toxicology*, v. 1, n. 1, p. 5–9, 2015.
- WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, v. 27, n. 45, p. 5904–5912, 2008.
- WITTE, R. P.; JOHN, W. Keratinocyte-fibroblast paracrine interaction: the effects of substrate and culture condition. *Biomaterials*, v. 26, p. 3673–3682, 2005.
- WONG, T.; MCGRATH, J. A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology*, v. 156, p. 1149–1155, 2007.

YANOFSKY, V. R.; MERCER, S. E.; PHELPS, R. G. Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Journal of Skin Cancer*, v. 2011, p. 1–13, 2011.

YU, J. R. et al. Current and Future Perspectives on Skin Tissue Engineering: Key Features of Biomedical Research, Translational Assessment, and Clinical Application. *Advanced Healthcare Materials*, v. 8, n. 5, p. 1801471, 7 mar. 2019.

ZANONI, M. et al. Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. *Expert Opinion on Drug Discovery* Taylor and Francis Ltd, 4 mar. 2019.

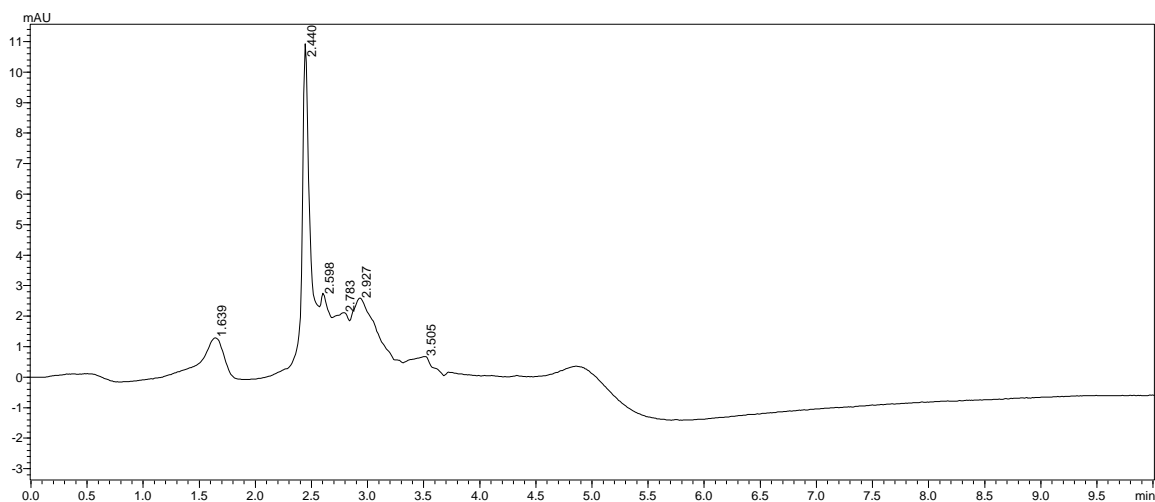
ZANONI, M. et al. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of Hematology and Oncology BioMed Central*, 16 jul. 2020.

ZHANG, K. et al. TUG1/miR-133b/CXCR4 axis regulates cisplatin resistance in human tongue squamous cell carcinoma. *Cancer Cell International*, v. 20, n. 1, 6 maio 2020.

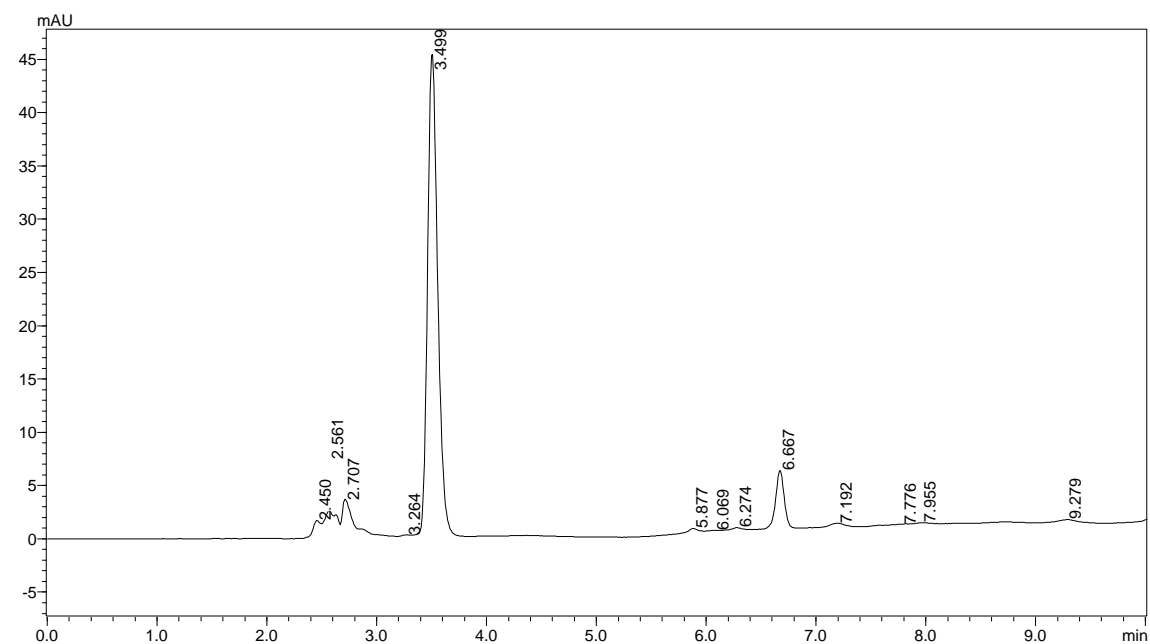
## ANEXO I

Cromatogramas ilustrativos do ensaio de permeação da cafeína em modelo de pele humana reconstruída in vitro (HaCat Skin) desenvolvido em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, dosagens realizadas no meio receptor.

### a. Solução Padrão de Cafeína 500 $\mu$ g/mL

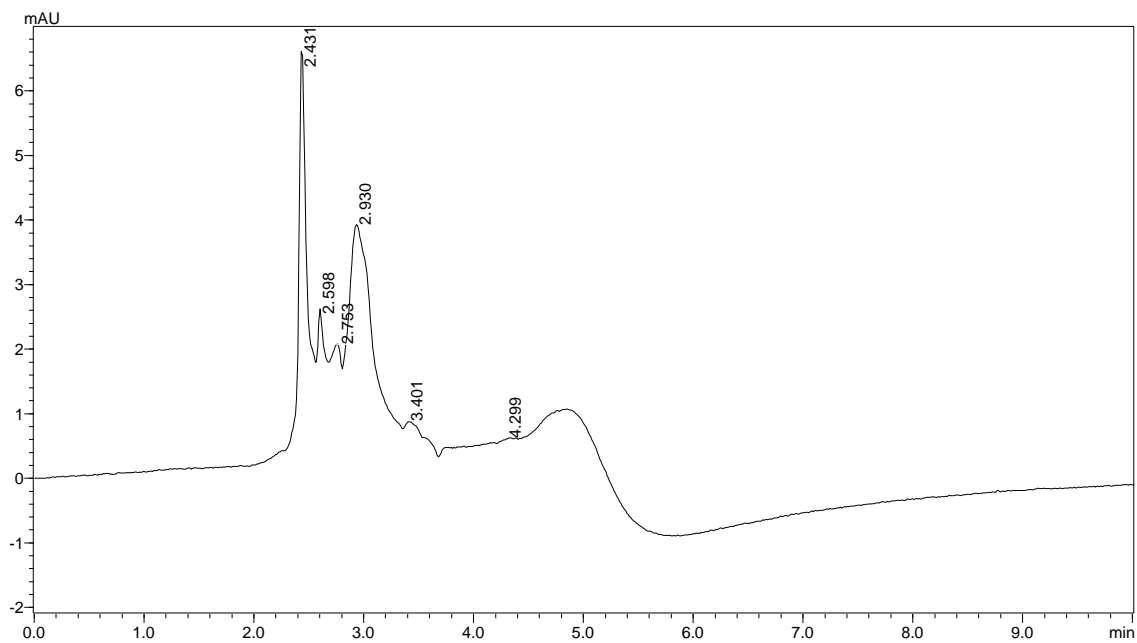


### b. Tempo 1 – 15 minutos

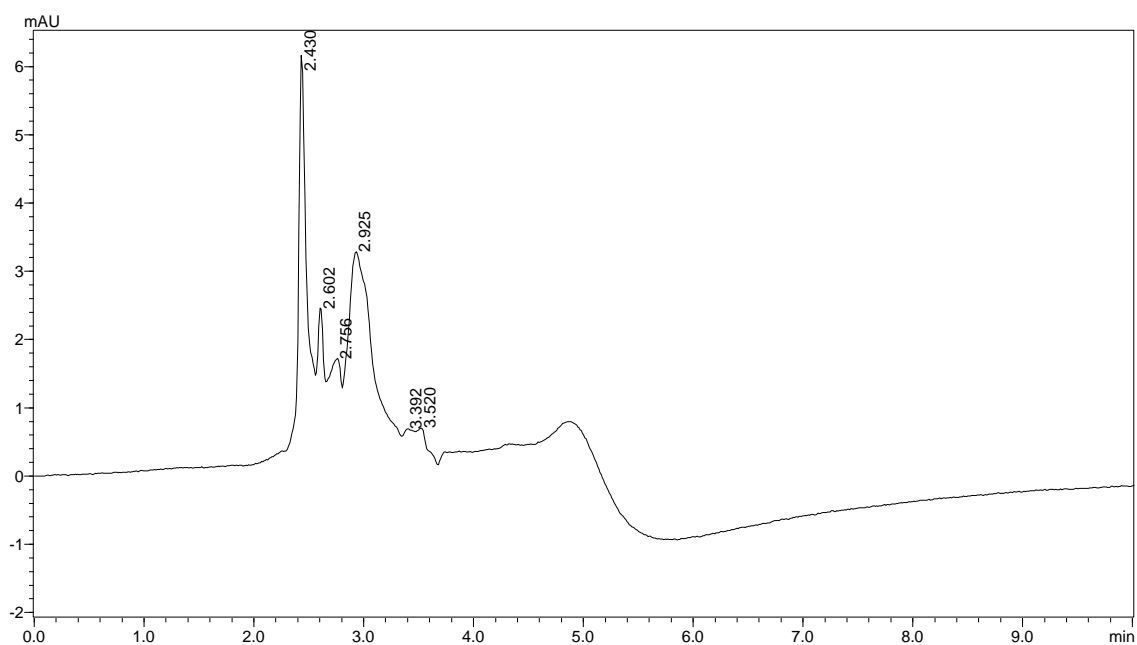




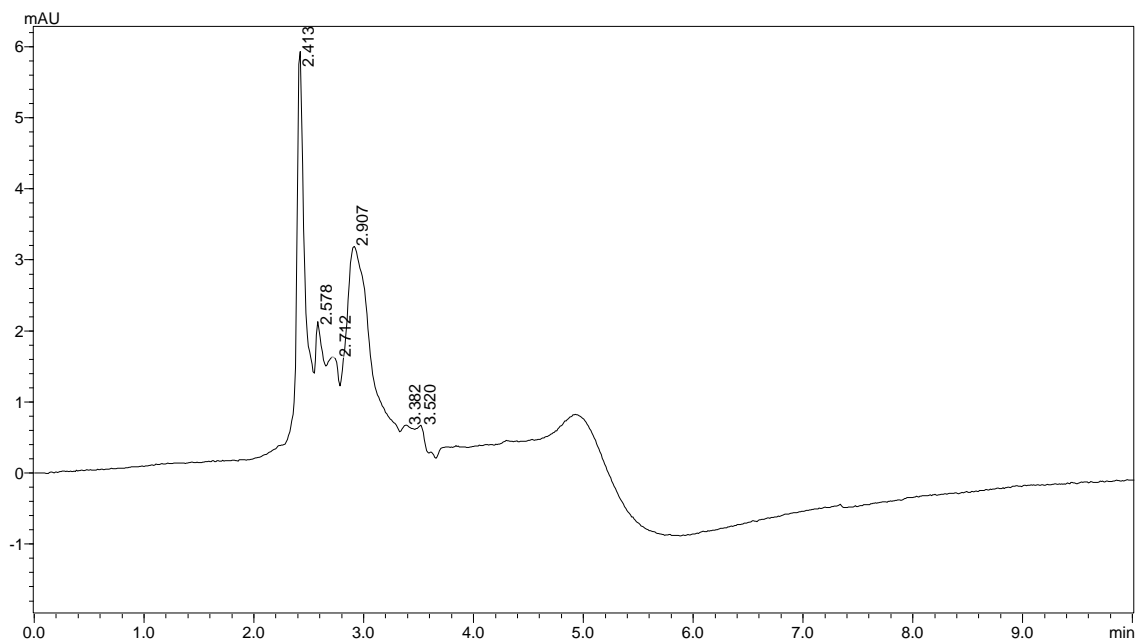
c. Tempo 2 – 30 minutos



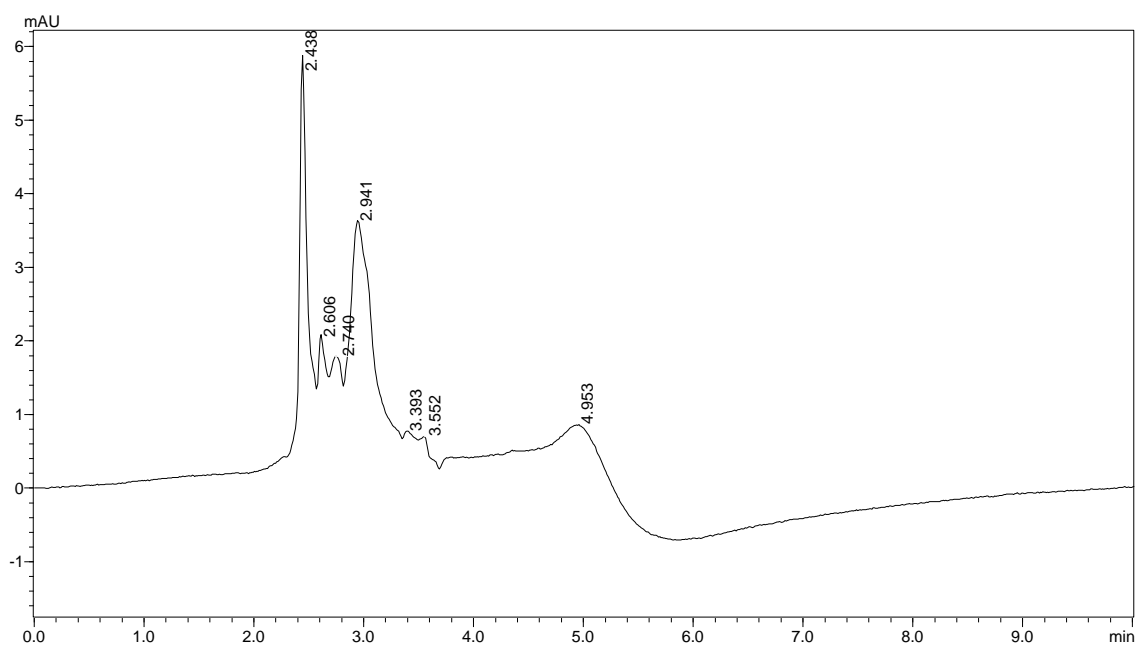
d. Tempo 3 – 45 minutos



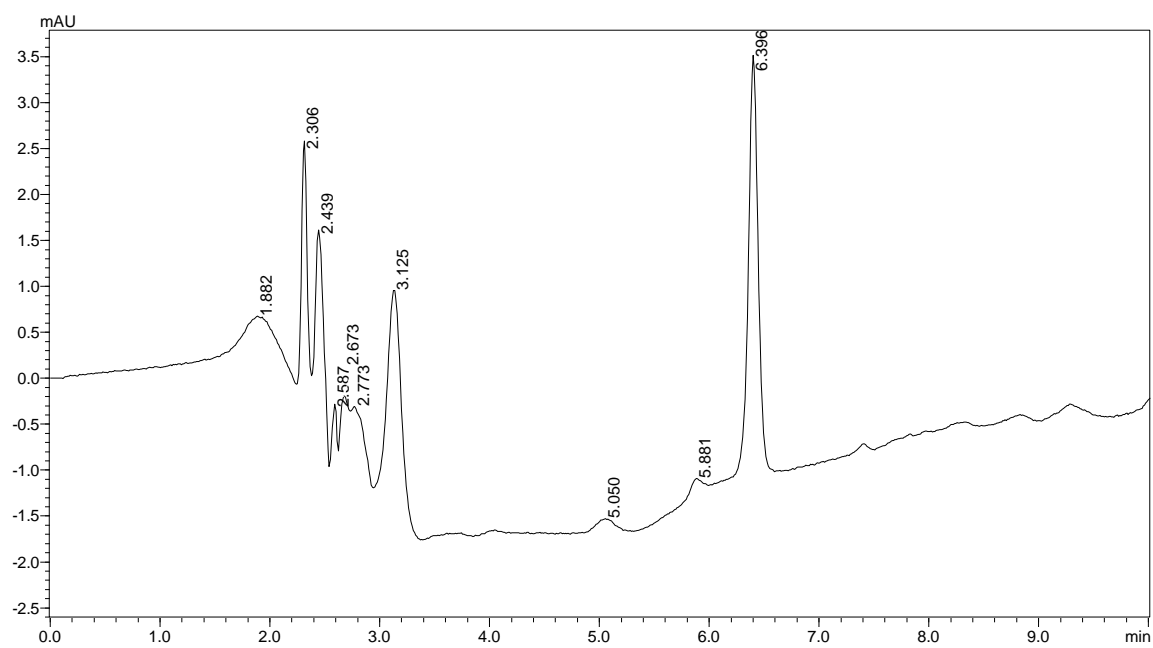
e. Tempo 4 – 1 hora



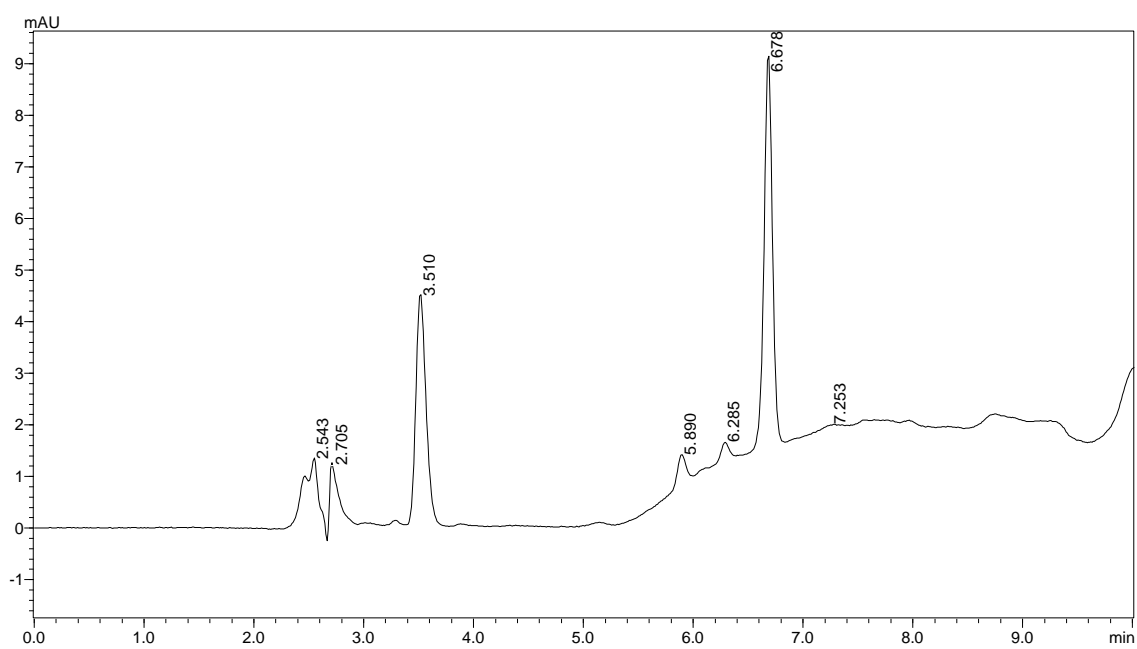
f. Tempo 5 – 2 horas



g. Tempo 6 – 3 horas



h. Tempo 7 – 4 horas



## ANEXO 2

Patente publicada - BR 10 2019 017285 1



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019017285-1 A2



\* B R 1 0 2 0 1 9 0 1 7 2 8 5 A 2 \*

(22) Data do Depósito: 20/08/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 02/03/2021

(54) **Título:** PELE HUMANA EQUIVALENE RECONSTRUÍDA IN VITRO UTILIZANDO CÉLULAS DE CULTURA PERMANENTE

(51) **Int. Cl.:** C12N 5/071; A61F 2/10.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS.

(72) **Inventor(es):** LEILANE BENTES DE SOUSA; MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS; EMERSON SILVA LIMA; ELENN SUZANY PEREIRA ARANHA; TATIANA DO NASCIMENTO PEDROSA.

(57) **Resumo:** PELE HUMANA EQUIVALENE RECONSTRUÍDA IN VITRO UTILIZANDO CÉLULAS DE CULTURA PERMANENTE é uma invenção que está relacionada com as áreas de pesquisa e desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais em experimentação, toxicologia e farmacologia, compreendendo um modelo de pele humana reconstruída in vitro totalmente constituída de células humanas (fibroblastos e queratinócitos) de cultura permanente, para utilização em modelos de estudos de avaliação da segurança de potenciais cosméticos e medicamentos, por meio de ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. Esta descoberta pode conduzir os estudos de desenvolvimento de novos métodos alternativos ao uso de animais na experimentação.

