



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LETÍCIA CRISTINE DE FARIA

**Análise do perfil de expressão de genes relacionados à
resistência a múltiplas drogas em cultura tridimensional de
células de melanoma cutâneo humano**

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: *Leticia Cristina de Lora*

Título do trabalho: *Análise do perfil de impressão de genes relacionados à resistência a múltiplas drogas em cultura tridimensional de células de melanoma cutâneo humano*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Leticia Cristina de Lora
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Adair Lúcio de Lira
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 04 / 09 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

LETÍCIA CRISTINE DE FARIA

**Análise do perfil de expressão de genes relacionados à
resistência a múltiplas drogas em cultura tridimensional de
células de melanoma cutâneo humano**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Lídia Andreu Guillo

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cristine de Faria, Leticia
Análise do perfil de expressão de genes relacionados à resistência a múltiplas drogas em cultura tridimensional de células de melanoma cutâneo humano [manuscrito] / Leticia Cristine de Faria. 2018.
CXXXVI, 136 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lídia Andreu Guillo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2018.
Bibliografia. Apêndice.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Cultura celular tridimensional. 2. Esferóides. 3. Melanoma cutâneo. 4. Resistência a múltiplas drogas. 5. Transportadores ABC.
I. Andreu Guillo, Lídia, orient. II. Título.

CDU 577.2

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado realizada por **Leticia Cristine de Faria**. Aos quatro dias do mês setembro de 2018, às 14:00 horas, reuniu-se no Anfiteatro do ICBII-UFG, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS EM CULTURA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO HUMANO", como parte de requisitos necessários à obtenção do título de Mestre, área de concentração **Patologia, clínica e tratamento das doenças humanas**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profª. Drª. Lidia Andreu Guillo**, iniciando os trabalhos concedeu à palavra a candidata, para exposição em até 50 minutos do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata aprovada ou reprovada.

Banca Examinadora

Aprovado(a)/Reprovado(a)

Profª. Drª. Lidia Andreu Guillo - Presidente
Profª. Drª. Lillian Carla Carneiro - Membro
Prof. Dr. Clever Gomes Cardoso - Membro
Profª. Drª. Erika Regina Leal de Freitas - Suplente

Aprovada
Aprovada
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata **Leticia Cristine de Faria** () Habilitada () Não habilitada. Nada mais havendo a tratar, eu, **Profª. Drª. Lidia Andreu Guillo**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura:

Profª. Drª. Lidia Andreu Guillo - Presidente
Profª. Drª. Lillian Carla Carneiro - Membro
Prof. Dr. Clever Gomes Cardoso - Membro
Profª. Drª. Erika Regina Leal de Freitas - Suplente

Lidia Andreu Guillo
Lillian Carla Carneiro
Clever Gomes Cardoso

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Leticia Cristine de Faria
Leticia Cristine de Faria

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO
DE MESTRADO**

Aluno(a): Letícia Cristine de Faria

Orientador(a): Lídia Andreu Guillo

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Lídia Andreu Guillo

2. Prof^a. Dr^a. Lilian Carla Carneiro

3. Prof^a. Dr. Clever Gomes Cardoso

OU

4. Prof^a. Dr^a. Erika Regina Leal de Freitas

Data: 04/09/2018

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Sílvia, pelo apoio e encorajamento em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela sabedoria, por renovar as minhas forças e disposição a cada momento, pelo discernimento e sustento concedidos a mim ao longo dessa jornada.

Aos meus pais por serem meus maiores incentivadores. O momento que vivo agora só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo o meu sonho.

Aos meus irmãos Herbert e Ana Luiza pelo carinho e afeto.

Á minha avó Edna Cruz pelo amor e palavras de sabedoria dirigidas a mim.

Á minha família pelo apoio, confiança e motivação incondicional.

Ao meu namorado Ricardo Pádua por sempre me impulsionar em direção às vitórias dos meus desafios.

Á Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Andreu Guillo por sempre acreditar em meu potencial de uma forma em que eu não acreditava ser capaz de corresponder, pela paciência na orientação, pela boa convivência e incentivo durante esse caminho.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo durante esse período. Vocês foram uma peça fundamental na realização deste trabalho.

Á toda equipe do Laboratório Multiusuário do IPSTP/UFG por gentilmente me ceder espaço.

Aos amigos e colegas que conquistei ao longo da vida, em especial Nilde Ribeiro e Amanda Gabrielly, pela força, compreensão e encorajamento constantes.

Aos amigos que conquistei no curso de Biomedicina e que também continuaram na trajetória acadêmica. Obrigada pelas trocas de conhecimentos e experiências que foram tão importantes para o meu novo olhar profissional.

Á CAPES pelo apoio financeiro.

Aos que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste sonho.
Muito obrigada!

TABELAS, QUADROS, FIGURAS, APÊNDICES	XI
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PELE HUMANA	1
1.2 CÂNCER	2
1.3 CÂNCER DE PELE	3
1.4 MELANOMA	4
1.4.1 Etiologia	5
1.4.2 Incidência	6
1.4.3 Aspectos clínicos do melanoma	7
1.4.4 Estadiamento	10
1.4.5 Diagnóstico	12
1.4.6 Prognóstico	14
1.4.7 Modalidades de tratamento	15
1.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR)	17
1.5.1 Transportadores ABC	22
1.6 CULTURA CELULAR	25
2. OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVOS GERAIS	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MÉTODOS	38
3.1 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA EM CULTURA CELULAR BIDIMENSIONAL	38
3.1.1 Descongelamento das células de melanoma humano	39
3.1.2 Subcultura celular	39
3.1.2 Criopreservação	40

3.2	PADRONIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS ESFERÓIDES	40
3.2.1	Cultura em microplaca com a superfície revestida com agarose .	40
3.2.2	Cultura em gotas suspensas.....	42
3.2.3	Cultura em placas de superfície não aderente.....	43
3.4	EXTRAÇÃO DO RNA DAS AMOSTRAS	45
3.5	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA).....	46
3.6	REAÇÕES DE RT-PCR CONVENCIONAL	47
3.7	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	48
3.8	PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	48
3.8.1	Padronização da concentração dos primers	48
3.8.2	Curva de eficiência de amplificação do qRT-PCR	50
3.9	REAÇÕES DE RT-PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	51
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4.	RESULTADOS	54
4.1	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA FORMAÇÃO DOS ESFEROIDES	54
4.1.1	Cultura em microplaca com a superfície revestida com agarose .	54
4.1.2	Cultura em gotas suspensas.....	56
4.1.3	Cultura em placas de superfície não aderente.....	58
4.2	REAÇÕES DE RT-PCR CONVENCIONAL	62
4.3	PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR EM TEMPO REAL.....	64
4.3.1	Padronização da concentração dos primers	64
4.3.2	Curva de eficiência de amplificação do qRT-PCR	66
4.4	REAÇÕES DE RT-PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	67
5.	DISCUSSÃO.....	70
6.	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICES	89

TABELAS, QUADROS, FIGURAS E APÊNDICES

Título	Página
TABELAS	
Tabela 1. Sistema de categorias TNM para o melanoma cutâneo	10
Tabela 2. Estadiamento clínico e histopatológico do melanoma cutâneo	12
Tabela 3. Principais diferenças entre cultura 2D e 3D	27
Tabela 4. Vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas para formar esferóides	36
Tabela 5. Condições de ciclagem utilizada na qRT-PCR no equipamento iCycler IQ5	53
Tabela 6. Valores de slope e eficiência para cada primer obtidos através da curva de eficiência de amplificação do qRT-PCR.	67
QUADROS	
Quadro 1. Componentes do master mix para a síntese de DNA complementar	46
Quadro 2. Sequência dos primers para os transportadores ABC (ABCB1, ABCB5 e ABCB8) e do gene constitutivo GAPDH utilizados na RT-PCR	47
Quadro 3. Sequência dos primers dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8, bem como do controle endógeno GAPDH, utilizados na qRT-PCR	49

FIGURAS

Figura 1. Organização histológica da pele humana	01
Figura 2. Estágios da progressão tumoral do melanoma	05
Figura 3. Características clínicas do melanoma	08
Figura 4. Característica clínica do melanoma lentigno maligno	09
Figura 5. Aspecto clínico do melanoma desmoplásico	09
Figura 6. Critérios ABCDE para diagnóstico do melanoma cutâneo	13
Figura 7. Desenho esquemático do Nível de invasão do melanoma cutâneo desenvolvido por Clark referente à localização do tumor em relação às camadas histológicas da pele	14
Figura 8. Desenho esquemático das camadas da pele de acordo com a espessura do tumor em milímetros segundo o índice de Breslow	15
Figura 9. Princípios da farmacocinética e farmacodinâmica da droga	18
Figura 10. Mecanismos de resistência a múltiplas drogas em célula tumoral	20
Figura 11. Mecanismos dos transportadores ABC	24
Figura 12. Modelo do processo de formação dos esferóides	28
Figura 13. Estrutura 3D dos esferóides e suas propriedades quando comparadas com a estrutura 2D	28
Figura 14. Esquema microambiente tumoral	30

Figura 15. Esquema da organização do esferóide	31
Figura 16. Técnicas mais comuns utilizadas para a formação de esferóides	33
Figura 17. Metodologia utilizada na execução do presente estudo	38
Figura 18. Esquema da placa de 96 poços com fundo redondo revestido com agarose, utilizada para a formação dos esferóides de células de melanoma humano da linhagem SKMEL-37	41
Figura 19. Formação dos esferóides em cultura de gotas suspensas de células de melanoma humano das linhagens A-375 e SKMEL-37, utilizando a placa Perfecta3D™ Hanging Drop 96-well	42
Figura 20. Esquema da distribuição das células A-375 e SKMEL-37 nas placas Nunclon Sphera	44
Figura 21. Esquema dos períodos de incubação dos esferóides formados na placa Nunclon Sphera	45
Figura 22. Esquema da placa utilizada na qRT-PCR para padronização da concentração de primer	49
Figura 23. Esquema da placa utilizada na qRT-PCR para realização da curva de eficiência de amostra	50
Figura 24. Representação esquemática da placa utilizada para as reações de qRT-PCR utilizando amostras de cDNA dos esferóides formados na placa Nunclon Sphera com 1×10^4 células das linhagens A-375 e SKMEL-37	52
Figura 25. Fotomicrografia dos esferóides formados com células de melanoma humano da linhagem SKMEL-37 em placas de 96 poços com a superfície revestida com agarose	54

Figura 26. Fotomicrografia das células SKMEL-37 de melanoma cutâneo humano que foram cultivadas em placa de 96 poços contendo 50 µl de gel de agarose	55
Figura 27. Fotomicrografia da formação dos esferóides na placa Perfecta3D Biomatrix	56
Figura 28. Fotomicrografia representando os esferóides que foram segregados após transferência da placa Perfecta3D Biomatrix para a placa de 96 poços revestidos com agarose	57
Figura 29. Fotomicrografia representativa dos esferóides após 08 e 10 dias de formação em gotas suspensas na placa Perfecta3D Biomatrix	58
Figura 30. Fotomicrografia das células A-375 e SKMEL-37 após centrifugação na placa Nunclon Sphera	59
Figura 31. Fotomicrografia do processo de formação dos esferóides na placa Nunclon Sphera	60
Figura 32. Fotomicrografia representando os esferóides incubados por 04, 06 e 07 dias após o período de 72 horas de sua formação na placa Nunclon Sphera	61
Figura 33. Fotomicrografia do processo de formação dos esferóides na placa Nunclon Sphera durante o período de 07 dias de incubação	62
Figura 34. Perfil do produto amplificado das reações de RT-PCR utilizando esferóides da linhagem A-375 formados com 1×10^4 células	63
Figura 35. Perfil de expressão dos produtos de RT-PCR utilizando esferóides formados com 1×10^4 células da linhagem SKMEL-37	64

Figura 36. Perfil das curvas de dissociação dos genes de interesse	65
Figura 37. Perfil da curva de dissociação do gene endógeno	66
Figura 38. Perfil de expressão dos genes ABCB1 e ABCB8 nos esferóides da linhagem de melanoma A-375	68
Figura 39. Perfil de expressão dos genes ABCB1 e ABCB8 nos esferóides da linhagem de melanoma SKMEL-37	69

APÊNDICES

Apêndice 1. (Artigo 1) Análise da expressão gênica do transportador ABCB5 e sua associação com a resistência a múltiplas drogas em melanoma cutâneo humano: uma revisão sistemática	90
Apêndice 2. (Artigo 2) Temporal variations in ABCB1 and ABCB8 gene expression in tridimensional cultures of human melanoma cells	103

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A-375	Linhagem da célula de melanoma cutâneo humano
ABC	Do inglês, <i>ATP binding cassette</i>
ABCB1	Transportador ABC da subfamília B, membro 1
ABCB5	Transportador ABC da subfamília B, membro 5
ABCB8	Transportador ABC da subfamília B, membro 8
ABCDE	Assimetria, Bordas, Coloração, Diâmetro e Evolução
ACS	Do inglês, <i>American Cancer Society</i>
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Do inglês, <i>Cycle threshold</i>
DEPC	Do inglês, <i>Diethylpyrocarbonate</i>
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Do inglês, <i>Dimethylsulfoxide</i>

DNA	Do inglês, <i>Desoxyribonucleic acid</i>
DPBS	Do inglês, <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dNTPs	Do inglês, <i>Deoxynucleotides</i>
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GAPDH	Do inglês, <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
gDNA	DNA genômico
GSH	L-glutathiona
GST	Glutathiona-S-transferase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M	Metástase
MD	Melanoma desmoplásico
MDR	Do inglês, <i>Multiple drug resistance</i>
MEC	Matriz extracelular
MEM	Do inglês, <i>Minimum Essential Media</i>
MES	Melanoma expansivo superficial
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MLA	Melanoma lentiginoso acral
MLM	Melanoma lentigo maligno
MN	Melanoma nodular
N	Linfonodos
NASA	Do inglês, <i>National Aeronautics and Space Administration</i>

NDB	Do inglês, <i>Nucleotide binding domains</i>
NS	Não significativo
O ₂	Oxigênio
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	Do inglês, <i>real time RT-PCR</i>
RNA	Do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	Do inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro fetal bovino
SKMEL-37	Linhagem da célula de melanoma cutâneo humano
TBE	Tris-Borato-EDTA
TMD	Do inglês, <i>Transmembrane domains</i>
UV	Ultravioleta

SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor
≤	Menor e igual
α	Alfa

Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
μL	Microlitro
μM	Micrômetro
μg	Micrograma
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
Kda	Kilodalton
mL	Mililitro
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
U	Unidade
xg	Força centrífuga máxima

Melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele sendo considerado agressivo devido sua evolução rápida, alta predisposição para metástase e a baixa eficácia dos atuais tratamentos em estágios avançados. O mau prognóstico resulta principalmente da resistência intrínseca aos quimioterápicos com a capacidade de conferir resistência a múltiplas drogas (MDR). Dentre os diversos mecanismos relacionados ao fenótipo de MDR, o melhor caracterizado envolve a expressão da superfamília de transportadores do tipo ABC, dependente de ATP, identificados como facilitadores do efluxo de drogas. Nesse contexto, torna-se importante a busca de modelos que possibilitam compreender o comportamento da célula e do microambiente tumoral. Os modelos de cultura tridimensionais têm sido propostos por mimetizar o microambiente tumoral através da interação célula-célula e célula-matriz extracelular. Diante disso, este estudo analisou o perfil de expressão dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8 nas células de melanoma cutâneo humano em modelo de cultura tridimensional através da formação de esferóides. Células de melanoma cutâneo das linhagens A-375 e SKMEL-37 foram cultivadas em monocamada e posteriormente foram utilizadas para a formação dos esferóides utilizando 3 métodos diferentes: 1) cultura em placa com a superfície revestida com agarose; 2) cultura em gotas suspensas; 3) cultura em placas com superfície não aderente. A análise da expressão dos genes ABCB1, ABCB5 e ABCB8 foi realizada através de RT-PCR e a visualização dos amplicons foi feita por eletroforese em gel de agarose. Reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas para a quantificação da expressão desses genes utilizando o método $\Delta\Delta CT$. A análise dos dados foi realizada através de *One Way ANOVA*, seguida de pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Nossos resultados demonstraram que o modelo de cultura celular tridimensional em placas com a superfície não aderente foi a técnica mais eficaz, simples de executar e de alto rendimento para a formação dos esferóides. Através da RT-PCR observamos que o gene ABCB5 não foi expresso nas linhagens celulares estudadas e este dado foi confirmado na RT-PCR em tempo real. Os genes ABCB1 e ABCB8 foram expressos tanto nos esferóides formados pelas células A-375 quanto SKMEL-37. Nessas duas linhagens celulares observamos que há um aumento significativo da expressão dos genes ABCB1 e ABCB8 ao término de 07 dias de incubação em relação ao controle. Estes achados nos mostram que o modelo de cultura tridimensional através da formação dos esferóides proporcionou a análise da expressão dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8, sendo estes associados a atividade de resistência a drogas em melanoma cutâneo humano.

Palavras-Chave: Cultura celular tridimensional, Esferóides, Melanoma cutâneo, Resistência a múltiplas drogas, Transportadores ABC.

Cutaneous melanoma is a type of skin cancer being considered aggressive due to its rapid evolution, high predisposition to metastasis and the low effectiveness of current treatments in advanced stages. Poor prognosis results mainly from the intrinsic resistance to chemotherapy with the ability to confer resistance to multiple drugs (MDR). Among the several mechanisms related to the MDR phenotype, the best characterized involves expression of the superfamily of ATP-dependent ABC transporters, identified as facilitators of drug efflux. In this context, it becomes important to search for models that make it possible to understand the behavior of the cell and the tumor microenvironment. Three-dimensional culture models have been proposed by mimicking the tumor microenvironment through cell-cell and extracellular matrix-cell interaction. Therefore, this study analyzed the expression profile of the ABCB1, ABCB5 and ABCB8 transporters in human cutaneous melanoma cells in a three-dimensional culture model through the formation of spheroids. Cutaneous melanoma cells from the A-375 and SKMEL-37 lineage were cultured in a monolayer and later were used for spheroid formation using 3 different methods: 1) agarose-coated plate culture; 2) culture in hanging drop; 3) culture in plate with non-adherent surface. Expression analysis of the ABCB1, ABCB5 and ABCB8 genes was performed by RT-PCR and visualization of the amplicons was done by agarose gel electrophoresis. Real-time RT-PCR reactions were performed for the quantification of the expression of these genes using the $\Delta\Delta CT$ method. Data analysis was performed through One Way ANOVA, followed by Tukey post-test ($p \leq 0.05$). Our results demonstrated that the three-dimensional cell culture model in plate with the non-adherent surface was the most efficient, simple to perform and high efficiency technique for spheroid formation. Through RT-PCR we observed that the ABCB5 gene was not expressed in the cell lines studied and this data was confirmed in real time RT-PCR. The ABCB1 and ABCB8 genes were expressed on the spheroids formed by cells A-375 and SKMEL-37. In these two cell lines we observed that there is a significant increase in the expression of the ABCB1 and ABCB8 genes at time 07 in relation to the control. These findings show that the three-dimensional culture model through spheroid formation provided expression analysis of the ABCB1, ABCB5 and ABCB8 transporters, which are associated with drug resistance activity in human cutaneous melanoma.

Keywords: ABC transporters, Cutaneous melanoma, Resistance to multiple drugs, Three-dimensional culture, Spheroids.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pele humana

A pele, o maior órgão do corpo humano, é composta pela epiderme e derme. Além disso, possui um tecido adiposo subcutâneo, denominado hipoderme (figura 1) (BANDARCHI et al., 2013). Essas camadas promovem uma barreira mecânica no organismo com o meio ambiente e exercem diversas outras funções, tais como: regulação da temperatura corporal; produção de vitamina D; funções sensoriais; proteção contra lesões por radiação ultravioleta, reagentes tóxicos e infecções (SANCHEZ et al., 2014; SADOZAI et al., 2017; ROSS et al., 2018).

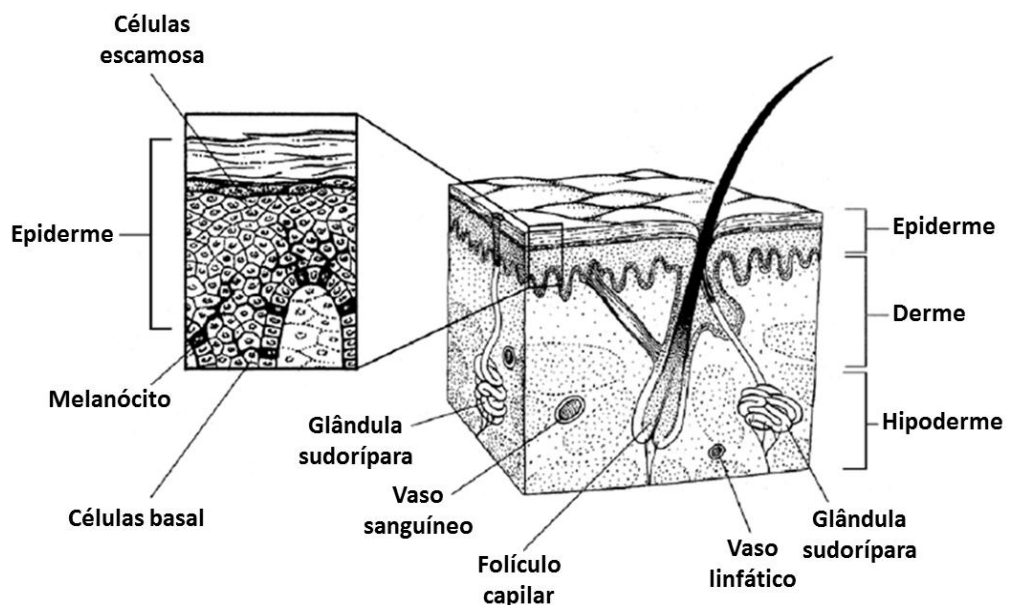


Figura 1: Organização histológica da pele humana. Representação das camadas que formam a pele e os diferentes tipos celulares que compõem essas camadas. Imagem adaptada de AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016.

A epiderme é a camada mais externa da pele, compacta e praticamente impermeável, formando a primeira barreira física contra agentes externos (BROHEM et al., 2014). A estrutura da epiderme é constituída por três tipos celulares principais: células escamosas, células basais e melanócitos. As células escamosas (queratinócitos) estão

localizadas na parte externa da epiderme. As células basais estão na parte inferior da epiderme e dividem-se frequentemente para formar novas células a fim de substituir as células escamosas que desgastam na superfície da pele. Os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme, são células dendríticas derivadas da crista neural embrionárias (melanoblastos) e possuem a capacidade de produzir melanina, o pigmento marrom que dá cor à pele e a protege contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (BANDARCHI et al., 2013; SANCHEZ et al., 2014; SANDRU et al., 2014; AVILA et al., 2016; ROSS et al., 2018).

1.2 Câncer

O câncer compreende uma série de doenças, cuja característica principal é a perda do controle normal da proliferação e crescimento celular. Isso leva à desdiferenciação celular, crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). As células cancerígenas se dividem mais rapidamente do que as normais e com o tempo, podem se acumular umas sobre as outras, formando uma massa de tecido chamado tumor. Atualmente, o câncer representa a segunda maior causa isolada de mortalidade no mundo (SAMPIERI; FODDE, 2012; INCA, 2018).

Sistemas de reparo do DNA estão presentes em todas as células, protegendo essa molécula contra os danos que ocorrem constantemente. Normalmente há um equilíbrio entre proliferação celular, diferenciação e apoptose. Entretanto, as células cancerígenas não respondem aos mecanismos que inibem o crescimento e a divisão celular, pois há mutações no genoma celular que controla esses processos. Essas mutações podem ser devido a erros espontâneos na replicação do DNA, radiação, carcinógenos químicos ou vírus (PELTOMAKI, 2012). Essas alterações genéticas podem ser herdadas ou adquiridas somaticamente em consequência de processos endógenos ou da exposição aos vários fatores externos, tais como fatores ambientais, hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. Esses fatores causais podem interagir de várias

formas, aumentando as chances de transformação de uma célula normal em célula cancerígena (YATES; CAMPBELL, 2012; SINGH; SALAMA, 2016).

O modelo clássico para explicar os mecanismos de carcinogênese é o da iniciação, promoção e progressão. O processo é iniciado em uma única célula por meio de estímulos que irão gerar alterações genóticas. Essas mutações podem comprometer os mecanismos que regulam o crescimento e desenvolvimento celular. A fase de promoção consiste em múltiplas e sucessivas expansões clonais, sendo guiadas pelo acúmulo de alterações do genoma, ocorrendo, assim, a transferência do material genético contendo mutações para as células-filhas. Após a fase de promoção, ocorre a fase da progressão, na qual várias células possuem potencial de invasão tecidual e formação de metástase. Nessa fase, as células cancerígenas irão se estabelecer, crescendo e interagindo com células do microambiente tumoral (SEKULIC et al., 2008; YATES; CAMPBELL, 2012; SIENA, 2016).

1.3 Câncer de pele

O câncer de pele é o tipo mais comum de câncer em humanos, apresentando distribuição universal. Trata-se do câncer mais frequente no Brasil, correspondendo a 30% dos casos de tumores malignos registrados no país (INCA, 2018). Como a pele é constituída por diferentes células, este tipo de câncer é classificado de acordo com as células que dão origem a neoplasia. De modo geral, o câncer de pele pode ser classificado em dois tipos: não melanoma e melanoma. O câncer de pele não melanoma possui origem principalmente em células escamosas ou em células basais, sendo estes denominados como carcinoma de células escamosas e carcinoma de células basais, respectivamente (MADAN et al., 2010; BANDARCHI et al., 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Entre os tipos de câncer de pele, o tipo não melanoma é o de maior incidência e se detectado precocemente, apresenta altos percentuais de cura e baixa mortalidade (INCA, 2018). O melanoma surge a partir de células melanocíticas (células que produzem pigmento), na qual estão localizadas na camada basal da epiderme (BANDARCHI et al., 2013).

1.4 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna originada através da proliferação descontrolada dos melanócitos, que são células que se encontram principalmente na pele e nos olhos e, em menor grau, em uma ampla gama de tecidos corporais, sendo responsáveis pela produção de melanina (SHAIN; BASTIAN, 2016). Sendo assim, o melanoma envolve principalmente a pele, mas também podem surgir nos olhos (conjuntiva púvea e corpo ciliar), meninges e em diversas superfícies de mucosas (GARBE, 2010). Alguns melanomas não produzem melanina e podem aparecer rosa, bronzeado ou mesmo branco, sendo caracterizados como amelanóticos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Os melanócitos são células dendríticas originárias de células pluripotentes da crista neural embrionária que gradualmente durante o desenvolvimento se tornam da linhagem específica e migram para a camada basal da epiderme onde amadurecem e produzem a melanina (BANDARCHI et al., 2013; ROSS et al., 2018; SADOZAI et al., 2017).

A melanina além de ser um pigmento que determina a cor da pele, desempenha um papel crucial na proteção da pele contra a radiação solar ultravioleta (SADOZAI et al., 2017).

Modelos de progressão tumoral mostram que a melanogênese é um processo durante o qual os melanócitos normais sofrem hiperplasia e posteriormente displasia, evoluindo para neoplasia (MARKOVIC et al., 2007; BRECHTBUHL, 2014).

É caracterizado como fase radial do crescimento o início do desenvolvimento dessa neoplasia, onde as células tendem a crescer horizontalmente entre as camadas da derme e epiderme, não apresentando potencial para metástase e caracterizando os melanomas *in situ*. Posteriormente, essas células invadem a derme subjacente, formando ninhos celulares e caracterizando a fase vertical do crescimento. É nessa fase em que as células adquirem capacidade invasão vascular e linfática, bem como potencial para metástase (figura 2) (BRECHTBUHL, 2014).

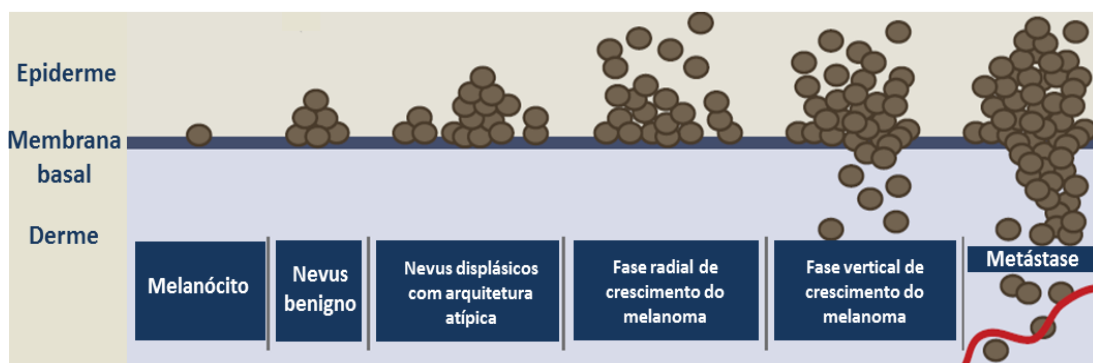


Figura 2: Estágios da progressão tumoral do melanoma. Os melanócitos normais sofrem hiperplasia (nevus benigno) e este aumento do número de células desencadeia uma displasia. Posteriormente, o nevus formado evolui para neoplasia, com potencial para metástase. Adaptado de VULTUR & HERLYN, 2013.

As células de melanoma são caracterizadas por instabilidade genética e alta capacidade de migrar para tecidos circundantes, portanto, o melanoma tem uma grande propensão à disseminação. A metástase é um processo complexo e as taxas de sobrevivência do melanoma metastático são baixas (<15%) (BANDARCHI et al., 2013; ROSS et al., 2018). Estudos têm demonstrado que o melanoma tem disseminação por via linfática e hematogênica de forma simultânea, com potencial para metástase em qualquer órgão, mas em porcentagens diferentes: pele (10-60%), pulmão (10-40%), linfonodos extra-regionais (5-35%), tecido subcutâneo (5-35%), fígado (14-20%), osso (4-17%), trato gastrointestinal (1-8%), pâncreas (3%), coração, rim, tireoide e útero (<1%) (SANDRU et al., 2014).

1.4.1 Etiologia

O melanoma cutâneo é uma doença multifatorial e os mecanismos que conduzem à transformação maligna de melanócitos ainda são pouco compreendidos. No desenvolvimento de melanoma maligno, existe uma interação entre fatores exógenos (ambientais) e endógenos (genéticos e imunológicos) (SANCHEZ et al., 2014).

Os fatores exógenos associados ao desenvolvimento do melanoma são: história prévia de melanoma, histórico familiar de melanoma, tom de pele, idade, sexo, imunossupressão, cicatrizes, exposições químicas, xeroderma pigmentoso e presença aumentada de nevos (lesões benignas

dos melanócitos) (UONG; ZON, 2010; RASTRELLI et al., 2014; SADOZAI et al., 2017). O principal fator de risco exógeno é a radiação solar UV, bem como raios UV de camas de bronzamento (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Como 70% dos melanomas se desenvolvem a partir de melanócitos da pele normal, seu desenvolvimento é resultado de múltiplas e progressivas alterações no DNA celular, que podem ser causadas por diversos mecanismos, tais como: ativação de proto-oncogenes, por mutações ou deleções de genes supressores de tumor ou por alteração estrutural dos cromossomos. Consequentemente, esses melanócitos malignos podem proliferar e se disseminar (FILIPPIN, 2013; AVILA et al., 2016).

1.4.2 Incidência

O melanoma cutâneo representa um problema de saúde pública em muitos países porque sua incidência aumentou de forma constante nos últimos 30 anos e as estatísticas estimam a duplicação de incidência a cada 10-20 anos (SANDRU et al., 2014). Além disso, as opções terapêuticas atuais são ineficazes para muitos pacientes (SAMPLE; HE, 2018).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, o tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos para o ano de 2018 será o de pele não melanoma. Quanto ao melanoma, representa apenas 4% do total de doenças malignas cutâneas. Entretanto, apesar de ter uma incidência relativamente baixa, assume grande importância devido ao seu elevado potencial de gerar metástase e a sua letalidade (SINGH; SALAMA, 2016; INCA, 2018). As maiores taxas estimadas encontram-se na região do Sul do país, acometendo principalmente pessoas do sexo masculino (INCA, 2018).

As taxas de incidência e mortalidade são mais elevadas entre os adultos mais velhos (55-84 anos). No entanto, o melanoma é o câncer mais comum em adultos jovens de 25 a 29 anos (JOHNSON et al., 2017).

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, estima-se 91.270 novos casos de melanoma nos Estados Unidos em 2018 e cerca de 9.320 casos de mortalidade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

A Organização Europeia do Câncer estima que as taxas de mortalidade por melanoma diminuam apenas em 2050, desde que sejam desenvolvidos tratamentos terapêuticos mais eficazes (SAMPLE; HE, 2017).

1.4.3 Aspectos clínicos do melanoma

O melanoma apresenta uma sequência de etapas bem definidas por evidências clínicas e histopatológicas, progredindo de lesões proliferativas benignas, passando por melanomas primários sem evidência de metástase, chegando a lesões invasivas primárias e finalmente metástase (DAMSKY et al., 2014). O melanoma é classificado em quatro principais subtipos histológicos, sendo eles: melanoma expansivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentiginoso acral (MLA) e melanoma lentigo maligno (MLM). No entanto, nos últimos anos vários novos subtipos clínicos também foram definidos. Estes incluem o melanoma desmoplásico (DM). O sistema de classificação que depende de características clínicas e morfológicas produz pouco valor de prognóstico, entretanto, serve como uma estratégia útil na identificação das várias formas histológicas da doença (VIROS et al., 2008; BASTIAN, 2014).

O melanoma expansivo superficial (MES) é o subtipo mais frequente, representando 70% de todos os casos. É comum a presença nas regiões do tronco, costas e extremidades. O MES apresenta-se como uma lesão plana ou ligeiramente elevada com pigmentação variável, como castanho, preto, róseo, violeta, hipopigmentação central. Possui uma evolução crônica e os melanócitos malignos podem se propagar lateralmente em toda a epiderme, surgindo nódulos elevados e sangramento, o que caracteriza o estágio mais avançado de crescimento vertical (figura 3A) (SCOLYER et al., 2011).

O melanoma nodular (MN) é o segundo mais frequente (15-35%). Acometem preferencialmente a região da cabeça e no pescoço. Apresenta-se como um nódulo crescente, de coloração homogênea enegrecida ou marrom-avermelhada e ocasionalmente ulceram-se e sangram. Podem ser amelanóticos em até 40% dos casos, representando um desafio no diagnóstico, uma vez que é, nesta situação, frequentemente confundido com

tumores benignos e lesões vasculares. Não há fase prévia de crescimento radial e possui um crescimento vertical agressivo (figura 3B) (MCCOURT et al., 2014).

O melanoma lentiginoso acral (MLA) é o tipo histológico mais agressivo dentre os melanomas, mais frequente em indivíduos não caucasianos. São máculas acastanhadas que se localizam na palma das mãos, planta dos pés, extremidades das digitais, sob as unhas e mucosas (figura 3C) (BANDARCHI et al., 2010).

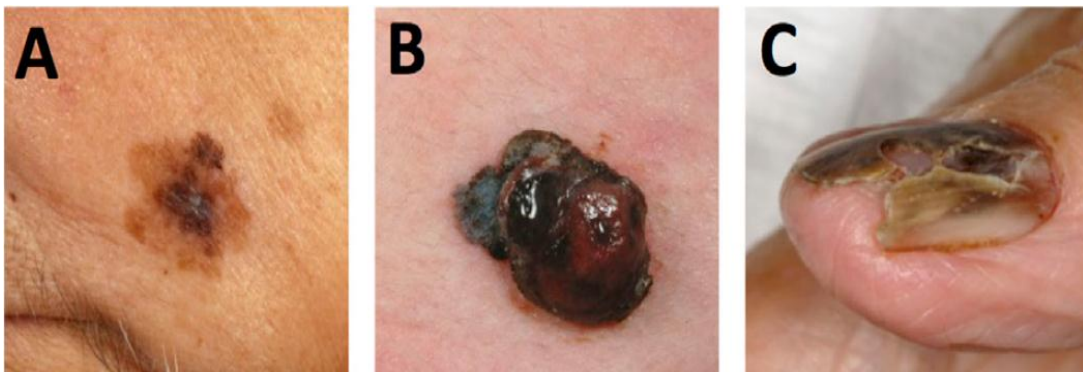


Figura 3: Características clínicas do melanoma. A) Melanoma expansivo superficial (MES), caracterizado por ser uma lesão plana, com bordas irregulares e variações de cor. B) Melanoma nodular (MN), apresenta-se como um nódulo de coloração enegrecida ou marrom-avermelhada. C) Melanoma lentiginoso acral (MLA) sob a unha, caracterizado por uma coloração marrom-enegrecida. Adaptado de SADOZAI et al., 2017.

O melanoma lentigo maligno (MLM) é pouco frequente (5-15%), mais comum em idosos e localiza-se em regiões que são expostas ao sol de maneira prolongada, como cabeça e pescoço. Apresenta-se na cor acastanhada ou enegrecida (figura 4) (SCOLYER et al., 2011).



Figura 4: Característica clínica do melanoma lentigo maligno (MLM). Este tipo de lesão melanocítica é plana, apresenta coloração variada com múltiplos tons de castanho-claro a tons enegrecidos e bordas irregulares. DERMIS, 2018.

O melanoma desmoplásico (DM) é uma forma rara de melanoma que compreende apenas 4% de melanomas primários. Caracterizado por proliferação invasiva de células fusiformes na derme e graus variados de deposição estromal de colágeno (desmoplasia). Apresenta-se principalmente na região da cabeça e pescoço de indivíduos idosos e está associado a maior probabilidade de recorrência, mas menor possibilidade de gerar metástase. Seu aspecto clínico é extremamente variável. Mais comumente apresenta-se como uma pápula ou nódulo não pigmentado, de aparência que não provoca dano físico. Devido às suas características clínicas inespecíficas, o diagnóstico muitas vezes é tardio (figura 5) (FERREIRA et al., 2015).



Figura 5: Aspecto clínico do melanoma desmoplásico (DM). Lesão apresentada como pápulas amelanóticas na região do ombro, área que é frequentemente fotoexposta. BARCAUI & MOURA, 2010.

1.4.4 Estadiamento

Denomina-se estadiamento o processo seguinte à identificação da lesão. É o principal critério para definir o tamanho do tumor e o tratamento que será realizado (MENDES, 2014).

O estadiamento do melanoma baseia-se na mais recente versão do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). São avaliadas características do tumor (T), dos linfonodos (N) e das metástases (M) (sistema TNM) (tabela 1) (BRECHTBUHL, 2014; BRIERLEY et al., 2017; GERSHENWALD et al., 2017).

Tabela 1: Sistema de categorias TNM para o melanoma cutâneo

CLASSIFICAÇÃO		
T	Espessura (mm)	Ulceração ou mitoses
T in situ	Não aplica	Não aplica
T1	≤ 1mm	a: sem ulceração ou mitoses ≤ 1/mm ² b: com ulceração ou mitoses ≥ 1/mm ²
T2	1,01 – 2 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 – 4 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
N	Número de linfonodos metastáticos	Tipo de metástase linfonodal
N0	0	Não aplica
N1	1	a: micrometástase* b: macrometástase**
N2	2-3	a: micrometástase* b: macrometástase** c: metástases em trânsito sem linfonodos positivos
N3	≥ 4 linfonodos acometidos ou agrupamento de linfonodos ou metástases em trânsito com linfonodos positivos	
M	Local	DHL sérica
M0	Sem metástase à distância	Não aplica
M1a	Pele, subcutâneo ou linfonodos à distância	Normal
M1b	Pulmão	Normal
M1c	Outras metástases viscerais Qualquer metástase à distância	Normal Elevada

(*) Micrometástases são diagnosticadas após a biópsia do linfonodo sentinela. (**) Macrometástases são metástases linfonodais clinicamente detectadas e confirmadas histopatologicamente. Adaptado de BALCH et al., 2009.

Tumor (T): pelo sistema TNM, o T acompanhado de um número (0 a 4) é usado para descrever o tamanho do tumor primário. Pode também ser atribuída uma letra minúscula "a" ou "b" com base do índice mitótico e na ulceração. O índice mitótico é determinado pelo número de células no processo de divisão (mitose) em uma determinada quantidade de tecido de melanoma. Um maior índice mitótico representa maior probabilidade da doença se disseminar. Ulceração é uma ferida da pele sobre o melanoma. Melanomas ulcerados tendem a ter um pior prognóstico (BRIERLEY et al., 2017; GERSHENWALD et al., 2017)

Linfonodo (N): o N no sistema TNM representa os linfonodos regionais e também é atribuído a ele um número (0 a 3), que indica se as células de célula disseminaram para os gânglios linfáticos. Pode também ser atribuída uma letra minúscula "a", "b" ou "c", conforme descrito no quadro 1 (BRIERLEY et al., 2017; GERSHENWALD et al., 2017).

Metástase (M): no sistema TNM, o M indica se a doença se disseminou para outras partes do corpo (BRIERLEY et al., 2017; GERSHENWALD et al., 2017).

De acordo com os dados obtidos pelo sistema TNM, o paciente será enquadrado no estadiamento clínico que é denominado somente para aquele em que os linfonodos regionais foram avaliados apenas por exame clínico e/ou radiológico e o estadiamento patológico quando os linfonodos regionais foram analisados microscopicamente, após linfadenectomia parcial ou completa (tabela 2). Os estadiamentos clínicos e patológicos categorizam, portanto, o melanoma em quatro estádios: 0 (tumor primário não identificado ou houve regressão total); I e II (melanoma localizado sem evidência de metástase); III (metástases regionais); IV (metástases distantes) (BRECHTBUHL, 2014; BRIERLEY et al., 2017; GERSHENWALD et al., 2017).

Tabela 2: Estadiamento clínico e histopatológico do melanoma cutâneo

ESTADIAMENTO CLÍNICO			
	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Qualquer T	N > N0	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1
ESTADIAMENTO HISTOPATOLÓGICO			
	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-4a	N1a	M0
	T1-4a	N2a	M0
IIIB	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a	N2c	M0
IIIC	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	T1-4b	N2c	M0
	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

O estadiamento clínico consiste na análise de linfonodos regionais por avaliação clínica e radiológica para metástases. O estadiamento histopatológico é caracterizado pela pesquisa histopatológica dos linfonodos regionais. Os pacientes com estádios 0 ou IA são exceção e não requerem avaliação patológica dos linfonodos. Adaptado de BALCH et al., 2009.

1.4.5 Diagnóstico

O diagnóstico precoce do melanoma cutâneo é vital, pois a taxa de sobrevivência por 5 anos em pacientes diagnosticados com melanoma de fase I representa 91-95% dos casos, enquanto nas demais fases a sobrevivência no mesmo período é menor, sendo: fase II (45-79%), fase III (30-70%) e fase IV (10-20%) (BRECHTBUHL, 2014; KOOLEN et al., 2017).

O diagnóstico baseia-se na anamnese e exame físico com análise da lesão através de um dermatoscópio. As lesões consideradas suspeitas são as que preenchem os critérios conhecidos por ABCDE, sendo A: assimetria; B= bordas irregulares; C= coloração mista; D= diâmetro maior ou igual a 5 mm; E= elevação/irregularidades na dimensão (figura 6). Diante de uma lesão suspeita, deve-se realizar a biópsia e a análise histopatológica para definição do tipo, estágio e prognóstico da neoplasia (ÁVILA, 2016).



Figura 6: Critérios ABCDE para diagnóstico do melanoma cutâneo. No melanoma as lesões podem se apresentar: **A**ssimétricas, **B**ordas irregulares, **C**ores múltiplas, **D**iâmetro maior que 6 mm e **E**volução da lesão. Adaptado de CLÍNICA PRIETO LUNA, 2010.

Usualmente, deve-se suspeitar de melanoma aquela lesão melanocítica de aparecimento abrupto ou que apresentou alterações clínicas recentes. Sinais de alerta como crescimento da lesão, alteração de cor (escurecimento ou clareamento), modificação na superfície ou presença de sintomas devem salientar a suspeita da doença (MARKOVIC et al., 2007).

Em comparação com as neoplasias internas, o diagnóstico do melanoma é considerado um processo relativamente rápido, com baixo custo e não invasivo (RASTRELLI et al., 2014).

1.4.6 Prognóstico

Considerando a diversidade clínica e heterogeneidade biológica do melanoma, novas ferramentas de diagnóstico para detectar a doença e prognóstico mais precoces são necessárias para identificar mais precisamente os pacientes em risco (ROSS et al., 2018).

O Nível de Clark foi desenvolvido por Wallace H. Clark Jr. em 1969, onde é realizada uma avaliação histopatológica que permite correlacionar com o prognóstico da doença. Ele propôs a subdivisão do melanoma em cinco níveis anatômicos: melanoma nível I acomete apenas a epiderme, o nível II acomete a derme papilar, o nível III compromete a interface entre a derme papilar e a reticular, o nível IV acomete a derme reticular e por fim, o nível V acomete o tecido subcutâneo (figura 7). Segundo Clark, quanto maior a profundidade de acometimento pelas células neoplásicas, maiores as chances de disseminação da doença (BALCH et al., 2009; MICHALANY, 2014).

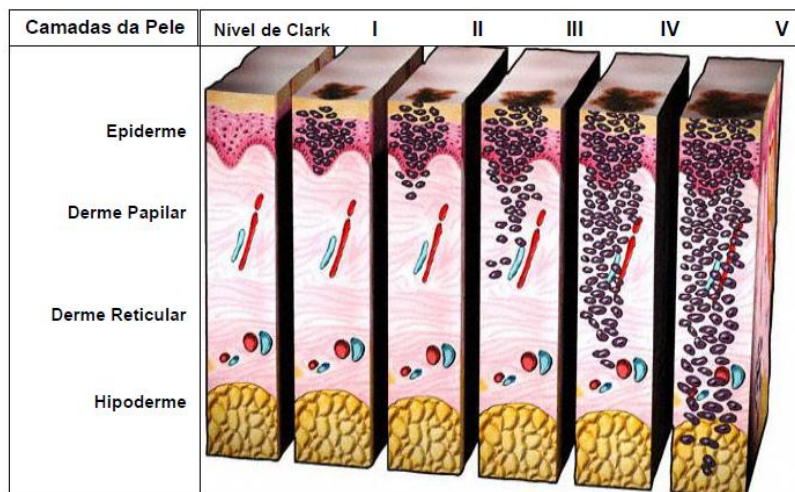


Figura 7: Desenho esquemático do Nível de invasão do melanoma cutâneo desenvolvido por Clark referente à localização do tumor em relação às camadas histológicas da pele. Adaptado de HALE, 2013.

No ano seguinte, Alexander Breslow propôs o Índice de Breslow, uma nova maneira de classificar o melanoma. Trata-se da medida em milímetros de espessura do tumor desde a parte superior do estrato granuloso da epiderme até a hipoderme. Nos casos de melanoma com ulceração, a

medida é feita a partir da base da úlcera até a célula presente mais profundamente na invasão (figura 8). O índice de Breslow apresenta maior reprodutibilidade e melhor correlação com o prognóstico quando comparado com os níveis de Clark (SANTOS; OLIVEIRA, 2014).

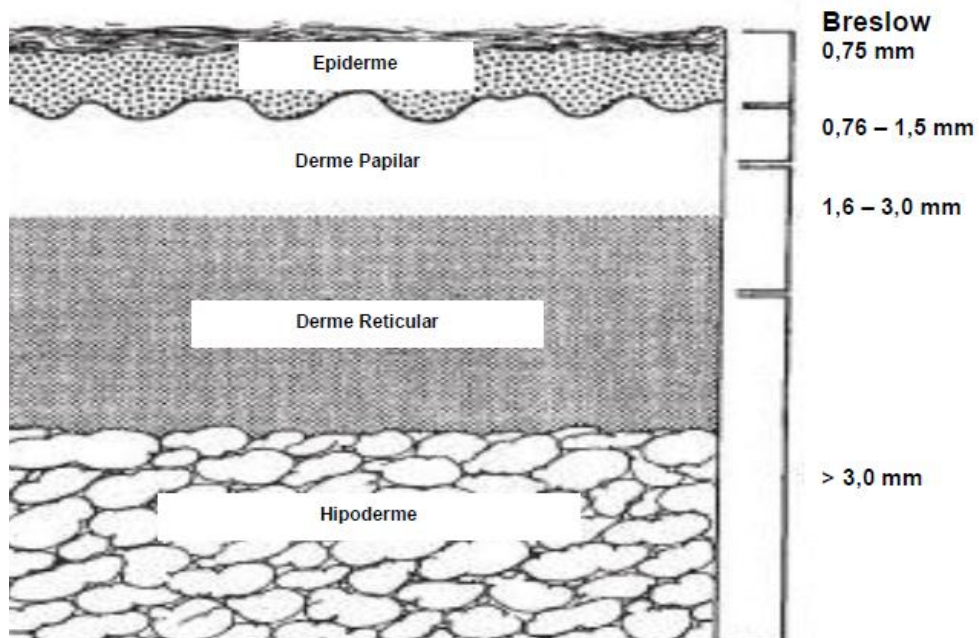


Figura 8: Desenho esquemático das camadas da pele de acordo com a espessura do tumor em milímetros segundo o índice de Breslow. Adaptado de HALE, 2013.

De modo geral, o melanoma possui bom prognóstico, com altas possibilidades de cura, quando diagnosticado em estágio inicial, razão pela qual a prevenção e o diagnóstico precoce assumem papel importante (ÁVILA et al., 2016).

1.4.7 Modalidades de tratamento

O tratamento do melanoma varia de acordo com o estadiamento da lesão e de seu tipo. Para os melanomas diagnosticados precocemente, a excisão cirúrgica com ampla margem de segurança é o tratamento de escolha, com a retirada do linfonodo sentinela, minimizando assim as chances de metástase (RODRIGUES, 2014). Contudo, para as fases mais adiantadas da doença, na fase metastática, a chance de cura é pequena. Isso ocorre devido a resistência terapêutica convencional (SINGH; SALAMA,

2016). Em geral, o melanoma tem baixa sensibilidade aos agentes citotóxicos e pode desenvolver o mecanismo de resistência a múltiplas drogas, o que dificulta a eficácia do tratamento (RORIGUES, 2014; ROSS et al., 2018).

Explorar oportunidades para diminuir o índice de mortalidade por este câncer é totalmente necessário. Portanto, avanços recentes na terapia nas áreas de genética, imunologia e biologia molecular ofereceram melhorias na sobrevida para alguns pacientes, uma vez que permite que o indivíduo responda de forma específica à terapia (RASTRELLI et al., 2014; JOHNSON, 2017).

O melanoma tem se destacado nos estudos da imunoterapia por apresentar resistência ao tratamento quimioterápico. Tal resistência está relacionada ao seu perfil imunogênico, sendo necessária a reformulação do sistema imunológico para que ele possa reconhecer e destruir as células cancerígenas (SANLORENZO et al., 2014; KEE; MCARTHUR, 2016). Atualmente, tais abordagens podem ser demonstradas a partir das terapias baseadas em citocinas, tais como a administração de Interferon- α e Interleucina-2 (BENDER et al., 2016).

Avanços na biologia molecular têm contribuído significativamente para o tratamento do melanoma, principalmente através da inibição do gene BRAF. Este gene está presente em 40-70% dos melanomas, levando à ativação e à proliferação celular descontrolada. Vemurafinib e Dabrafenib são inibidores BRAF específicos para melanomas e têm sido utilizados em terapias, juntamente com outras terapias direcionadas (MAVERAKIS et al., 2015).

A sobrevivência dos pacientes com melanoma cutâneo pode ser maior somente através de um esforço conjunto envolvendo uma detecção precoce, processo de estadiamento completo, tratamento adequado e um acompanhamento cuidadoso para detectar o aparecimento de metástase (BANDARCHI et al., 2010; SADOZAI et al., 2017).

1.5 Mecanismos de resistência a múltiplas drogas (MDR)

A quimioterapia é uma das abordagens mais eficazes para o tratamento de muitos tipos de tumores malignos, especialmente nos casos de câncer metastáticos (CHEN; GOTTESMAN, 2006). A eficácia da quimioterapia é um dos principais desafios no tratamento do câncer para alcançar a remissão duradoura e uma cura definitiva (BEGICEVIC; FALASCA, 2017).

O tratamento do melanoma em estágios mais avançados é bastante difícil, porque as células geralmente são resistentes às terapias convencionais, como radioterapia e quimioterapia (CHEN et al., 2009). A quimiorresistência é o principal obstáculo na eficácia das terapias contra o câncer, pois permite que as células cancerígenas sobrevivam ao tratamento e proliferem descontroladamente, levando a células com um fenótipo mais agressivo, que são mais capazes de gerar metástase para outros órgãos. Atualmente, nenhuma terapia tem 100% de eficácia, pois a resistência a drogas limita o potencial tanto dos agentes quimioterápicos convencionais, quanto dos novos agentes biológicos (GERETTO et al., 2017).

As drogas antineoplásicas geralmente são administradas sistemicamente, portanto, ocorre a absorção, distribuição, metabolismo e liberação nos tecidos-alvos onde será ativada, provocando um dano celular que poderá levar a morte celular (figura 9). Porém, nos casos de quimiorresistência, a farmacocinética e farmacodinâmica da droga pode sofrer variações, dificultando sua ação em gerar morte celular no tumor (SZAKÁCS et al., 2006; KACHALAKI et al., 2016).

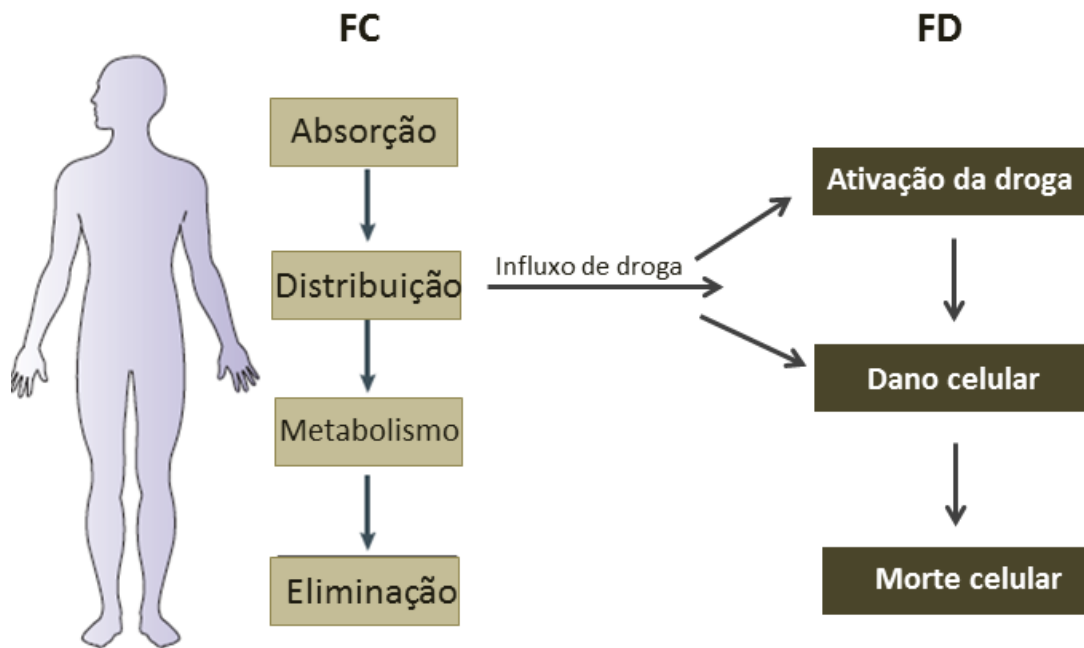


Figura 9: Princípios da farmacocinética e farmacodinâmica da droga. Os fatores farmacocinéticos (FC), tais como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, limitam a quantidade de uma droga administrado sistemicamente ao tumor. No tumor, os efeitos da droga na célula cancerígena correspondem as propriedades farmacodinâmicas (FD), que consistem na ativação da droga, dano celular e conseqüentemente a morte celular. Adaptado de HOLOHAN et al., 2013.

A resistência aos quimioterápicos pode ser dividida em duas categorias: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca indica que antes de receber a quimioterapia, os tecidos expressam de forma constitutiva moléculas e fatores com a capacidade de conferir resistência, o que tornam a terapia ineficaz. A resistência adquirida pode se desenvolver por mutações surgidas durante o tratamento farmacológico de células cancerígenas que eram anteriormente sensíveis à droga, bem como por várias outras respostas adaptativas, como aumento da expressão do alvo terapêutico e ativação de vias alternativas de sinalização compensatória (CHEN; GOTTESMAN, 2006; TOMÁS, 2006; HOLOHAN et al., 2013; GERETTO et al., 2017).

Um dos vários fatores que contribuem para a resistência aos fármacos é a redução da quantidade de droga que interage com o alvo específico e afeta o microambiente tumoral (KAPSE-MISTRY et al., 2014). O uso de múltiplas drogas com diferentes mecanismos de entrada nas células e diferentes alvos moleculares permite uma quimioterapia efetiva e altas taxas de cura. Entretanto, as células podem expressar mecanismos

que conferem resistência simultânea a várias drogas não relacionadas. Este fenômeno é conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR). A MDR é um grande obstáculo que limita severamente a eficácia da quimioterapia no tratamento do câncer, uma vez que as células cancerígenas desenvolvem resistência a classes farmacologicamente e estruturalmente distintas de drogas (SUN et al., 2012; CHEN et al., 2016; WANG et al., 2017). A MDR torna as células cancerígenas imunes aos tratamentos padrão com uma variedade de agentes antineoplásicos, levando à recorrência de tumores malignos, à recaída ou morte do paciente. Portanto, é um grande desafio na terapia do câncer combater este mecanismo de resistência (KAPSE-MISTRY et al., 2014; LI et al., 2017; WANG et al., 2017).

Vários mecanismos, sozinho ou em combinação, demonstraram estar envolvidos na resistência celular a drogas. Os principais mecanismos de MDR podem ser agrupados nas seguintes categorias: (1) diminuição do influxo de drogas; (2) bombas de efluxo de drogas; (3) inativação da droga por detoxificação; (4) mutação de alvos de drogas; (5) ativação de reparo de DNA; (6) inibição de vias de apoptose (figura 10) (HOLOHAN et al., 2013, CHEN et al., 2016; LI et al., 2017).

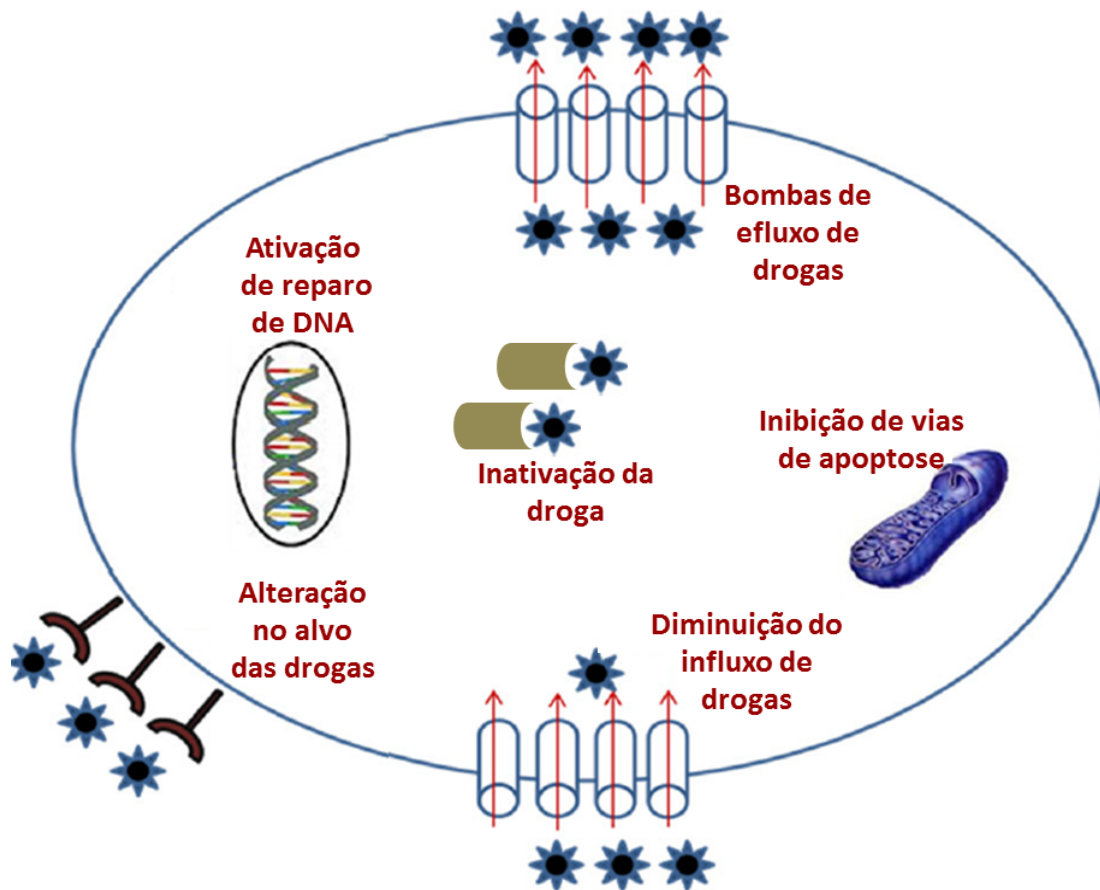


Figura 10: Mecanismos de resistência a múltiplas drogas em célula tumoral. Bombas de efluxo de drogas, inibição de vias de apoptose, diminuição do influxo de drogas, inativação da droga, alteração no alvo das drogas e ativação de reparo de DNA são os principais mecanismos que impede o acúmulo de droga intracelular, tornando as drogas ineficazes para o tratamento do câncer. Adaptado de KAPSE-MISTRY et al., 2014.

O mecanismo pelo qual quimioterápicos entram nas células depende de sua natureza química e muitos deles entram no ambiente intracelular utilizando-se de canais transportadores presentes na membrana plasmática celular. Assim, a resistência pode ser causa por uma redução da expressão ou de mutações que possam modificar a atividade desses transportadores, diminuindo a quantidade de droga que entra na célula (SZAKACS et al., 2006).

Outro importante mecanismo de defesa contra a ação dos quimioterápicos é a eliminação da droga do ambiente intracelular. Para tanto, transportadores localizados na membrana funcionam como bombas que fazem o efluxo da droga para fora da célula. A superfamília de proteínas transportadores do tipo ABC, dependentes de ATP (do Inglês *ATP-binding Cassette Protein*) é responsável por regular esse transporte de vários

agentes quimioterápicos através da membrana das células (TIWARI et al., 2011).

Uma vez dentro da célula, a droga ainda pode passar pelo processo de detoxificação, impedindo que esta reaja com seu alvo terapêutico, causando sua inativação. O sistema GSH-GST é um dos principais mecanismos de desintoxicação. GSH é um pequeno peptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina. É um importante antioxidante celular e tem a capacidade de coletar diretamente espécies reativas de oxigênio de uma maneira não enzimática. GST é uma família de enzimas que utiliza o GSH como cofator no metabolismo de vários agentes quimioterápicos, resultando na formação de conjugados que são mais solúveis em água do que seus compostos de origem. O nível elevado do sistema GSH-GST intracelular é muitas vezes implicado no desenvolvimento da resistência das células cancerígenas a várias drogas (JARDIM et al., 2013; WANG et al., 2015).

Alterações nos níveis de expressão ou mutações nos alvos dos quimioterápicos tem um grande impacto na quimiorresistência. Desta forma, a droga não reconhecerá seu alvo, impossibilitando seu influxo na célula (MILANE et al., 2011).

Grande parte das drogas antineoplásicas utilizadas na clínica induzem danos na molécula de DNA tanto de forma direta como indiretamente. A resposta celular ao dano no DNA é reparar o dano ou caso não seja possível, indução de morte celular. Nesse sentido, a capacidade que uma célula tumoral tem de reparar uma lesão do seu DNA causada por droga antineoplásica configura-se um mecanismo crucial no estabelecimento de resistência a vários quimioterápicos (WANG et al., 2015).

A apoptose é o principal tipo de morte celular desencadeada pelos quimioterápicos. Sinais apoptóticos recrutam moléculas proapoptóticas, que levam à ativação de caspases que são efetores de apoptose para causar dano celular. Há também fatores antiapoptóticos que impedem a ativação dessas caspases. A regulação positiva de proteínas antiapoptóticas e a regulação negativa de proteínas proapoptóticas estão associadas ao mau prognóstico de pacientes com câncer, pois inibe a morte celular por apoptose, causando uma resistência a drogas (INDRAN et al., 2011).

1.5.1 Transportadores ABC

Dentre os diversos mecanismos relacionados ao fenótipo de MDR em células cancerígenas humanas, o melhor caracterizado envolve a expressão da superfamília de transportadores do tipo ABC, dependente de ATP, identificados como facilitadores do efluxo de vários substratos através da membrana plasmática, incluindo drogas antineoplásicas, impedindo o acúmulo suficiente dessas drogas dentro da célula (XIA; SMITH, 2012; KAPSE-MISTRY et al., 2014; CHEN et al., 2016). A ampla especificidade de substratos e a abundância dos transportadores ABC explicam as dificuldades encontradas durante as últimas décadas na tentativa de evitar MDR mediada por estes transportadores (CHEN et al., 2016).

Os transportadores ABC consistem em 48 membros. Durante o sequenciamento do genoma humano todos os 48 genes dos transportadores ABC conhecidos foram descritos e caracterizados. Após algumas divergências na classificação dos transportadores, os genes e as proteínas codificadas por eles foram classificados em sete subfamílias de ABC-A a ABC-G com base em similaridades de sequência e organização estrutural (SZAKÁCS et al., 2006; SUN et al., 2012; XIA; SMITH, 2012).

Embora vários membros desta diversificada família de transportadores tenham funções envolvendo o transporte de substratos específicos, a complexa rede de funções fisiológicas destes transportadores desempenha papéis cruciais em muitos processos celulares (WANG et al., 2017). Além de serem responsáveis pela MDR em células cancerígenas, esses transportadores também são expressos em tecidos normais, como o epitélio dos rins, fígado, intestino, pâncreas, placenta e glândula adrenal, onde sua função é excretar metabólitos tóxicos (SZAKÁCS et al., 2006; TOMÁS, 2006; SUN et al., 2012). Evidências indicam que os transportadores ABC protegem o corpo humano contra substratos endógenos e exógenos, incluindo íons metálicos, peptídeos, aminoácidos, açúcares e um grande número de compostos hidrofóbicos e metabólitos através da membrana plasmática e também membranas intracelulares (TOMÁS, 2006; VASILIOU et al., 2009; FLETCHER et al., 2016).

Os transportadores ABC são definidos pela sua estrutura básica, consistindo em dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD) e dois domínios transmembrana (TMD). Os quatro domínios podem estar presentes dentro de uma cadeia polipeptídica, compreendendo um transportador completo ou dentro de duas proteínas separadas, compreendendo um meio transportador. Normalmente, cada TMD consiste em seis α -hélices, totalizando 12 α -hélice por transportador. O reconhecimento e ligação do substrato ocorrem nos domínios transmembrana, que formam uma estrutura semelhante a poros que se abrem para o espaço extracelular e abrange grande parte da profundidade da membrana (TIWARI et al., 2011; SUN et al., 2012; BEGICEVIC; FALASCA, 2017).

Estes transportadores medeiam o transporte de substratos através da membrana celular, contra um gradiente de concentração. As interações físico-químicas responsáveis pela ligação do substrato e mecanismos de translocação do substrato mediado pelo transportador ABC ainda são pouco compreendidas (CHEN et al., 2016). No entanto, é amplamente assumido que esta atividade requer energia derivada da hidrólise do ATP, associada à translocação do substrato. O transportador permanece em uma estrutura transmembrana fechada até que o substrato esteja presente e os dois NBD se liguem ao ATP. O ATP é hidrolisado em ADP e isso causa uma mudança conformacional na estrutura da proteína, separando os dois NBD, permitindo que o substrato seja exportado para fora da célula e restaura o estado conformacional estável do NBD que está pronto para ligação e transporte de outro substrato (figura 11) (SZAKÁCS et al., 2006; MOITRA et al., 2011; CHEN et al., 2016; BEGICEVIC; FALASCA, 2017). Enquanto os dois NBD se ligam e hidrolisam o ATP, os TMD participam no reconhecimento e translocação do substrato através da membrana lipídica (VASILIOU et al., 2009).

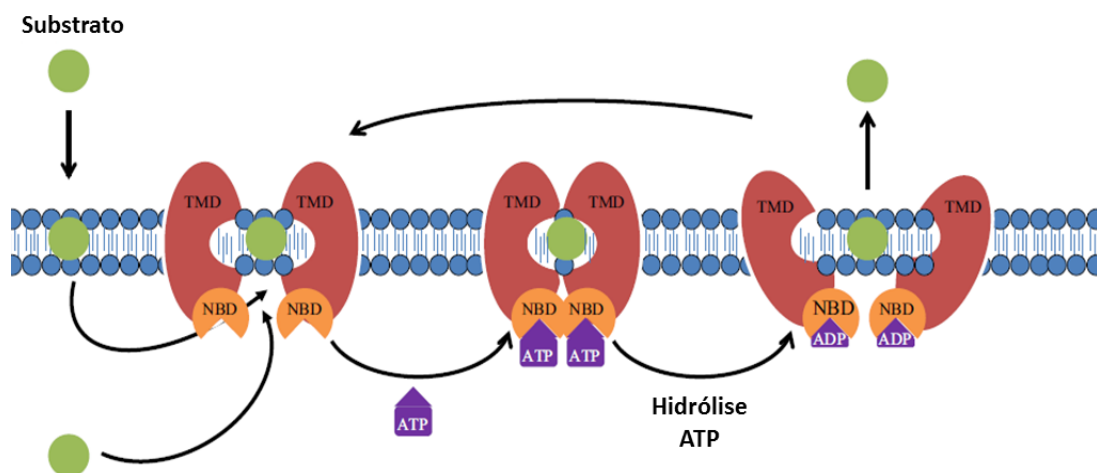


Figura 11: Mecanismo dos transportadores ABC. Transportadores ABC são bombas que facilitam o efluxo de vários substratos, incluindo drogas antineoplásicas. A membrana e os domínios formam a chave estrutural destes transportadores. O transporte da droga para o meio extracelular é dependente de energia ATP. Desta forma, o ATP ao ser hidrolisado possibilita a separação dos domínios. Adaptado de CHEN et al., 2016.

A associação entre transportadores de membrana celular e um fenótipo resistente a drogas foi encontrada pela primeira vez em 1970 por Ling et al., em células de ovário de hamster resistentes à colchicina (CHEN et al., 2016). A proteína associada a essa redução da permeabilidade do fármaco, uma glicoproteína de 170 kDa foi purificada em 1979 e mais tarde conhecida como P-gp (glicoproteína-P). Em 1985, o MDR1, gene que codifica a P-gp foi clonado. Este está localizado no cromossomo 7 em q21 e contém 28 éxons que codificam uma proteína de 1280 aminoácidos. Posteriormente, a P-gp foi caracterizada como transportador ABCB1 (SUN et al., 2012; XIA; SMITH, 2012). Após a identificação do ABCB1 associado à resistência a drogas, múltiplos transportadores que também conferem essa resistência foram identificados (MOITRA et al., 2011).

A expressão do transportador ABCB1 apresenta um amplo espectro de substrato, mediando a exportação de uma variedade de drogas de diferentes classes farmacológicas, reduzindo deste modo a concentração citotóxica terapêutica intracelular, tornando as drogas ineficazes. Estes substratos incluem fármacos quimioterápicos, agentes imunossupressores, anti-arrítmicos, bloqueadores de canais de cálcio, analgésicos, anti-histamínicos, antibióticos, produtos naturais, entre outros (SHAROM, 2011; LI et al., 2017). No tecido tumoral, a expressão do ABCB1 é geralmente maior em tumores que são derivados de tecidos que normalmente

expressam em níveis baixos este transportador, incluindo o cólon, rim, glândula adrenal, fígado e pâncreas (TOMÁS, 2006; GERETTO et al., 2017). Em muitos tumores, a superexpressão de ABCB1 determina a resistência intrínseca ao quimioterápico. No entanto, a quimioterapia também pode induzir a expressão dessa proteína, causando a resistência adquirida (GERETTO et al., 2017).

Um aglomerado de transportadores ABC é expresso em melanomas, incluindo ABCA9, ABCB1, ABCB5, ABCB8, ABCC2 e ABCD1 (SZAKACS et al., 2004; CHEN et al., 2006; FRANK et al., 2005; ELLIOT; AL-HAJJ, 2009). Sua presença é negativamente correlacionada com a eficácia clínica em resposta à terapia. Numerosos medicamentos antineoplásicos usados para o tratamento do melanoma, como a doxorrubicina, foram mostrados ser substrato para os transportadores ABC. Portanto, é importante avaliar a expressão destes transportadores, para facilitar a seleção de tratamento (SUN et al., 2012; XIA; SMITH, 2012).

1.6 Cultura celular

A abordagem usual e comum em pesquisas é a utilização de modelos animais para testes. No entanto, seu uso é limitado, pois existem muitas preocupações quanto ao desconforto ou dor de animais em determinadas condições experimentais e questões éticas (ELLIOT; YAN, 2011; HOARAU-VÉCHOT et al., 2018). Além disso, modelos animais podem não prever adequadamente a eficácia do teste quando comparado com humanos (CEKANOYA; RATHORE, 2014). A obtenção de concordância entre modelos animais e ensaios clínicos em humanos continua a ser desafiadora, com uma taxa média de 8% de resultados concordantes (MAK et al., 2014).

Essas limitações motivaram os pesquisadores a desenvolverem modelos *in vitro* para o estudo da biologia e fisiologia celular. O desenvolvimento de métodos *in vitro* é de grande importância para os campos da biotecnologia, estudo dos mecanismos das doenças, eficácia de droga, pesquisa sobre câncer, testes de toxicidade, bem como áreas da

engenharia de tecidos e medicina regenerativa (PAMPALONI et al., 2007; ELLIOT; YUAN, 2011). Em comparação com modelos animais, os modelos *in vitro* são propícios à investigação sistemática, repetitiva e quantitativa. Podem ser usados para avaliar diferentes combinações de parâmetros experimentais. Essas condições geralmente não são viáveis em modelos baseados em animais (ACHILLI et al., 2012).

A metodologia tradicional para o estudo *in vitro* de células de mamíferos é a cultura celular bidimensional (2D), conhecida também por cultura de células em monocamada (ELLIOT; YUAN, 2011). Neste modelo, uma população homogênea de células é cultivada em uma superfície de plástico, formando uma monocamada (BEAUMONT et al., 2014). A cultura de células 2D proporcionou inúmeros avanços conceituais na biologia celular e à compreensão da formação e função dos tecidos, órgãos, além de proporcionar compreensão de doenças, como o câncer (ACHILLI et al., 2012). Embora o modelo 2D tenha contribuído significativamente para a pesquisa biológica, ele possui certas limitações, pois a biologia é claramente um complexo sistema tridimensional (3D). As técnicas de cultura de células 2D não replicam fielmente todos os sinais mecânicos e bioquímicos, o perfil genético e morfológico presentes na célula *in vivo*. Além disso, nas técnicas 2D, predominam a interação das células com o plástico do frasco, em vez das interações cruciais célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), que constituem a base para a função celular normal (ACHILLI et al., 2012; BEAUMONT et al., 2014; LEVESQUE et al., 2014; HOARAU-VÉCHOT et al., 2018). Apesar destas desvantagens, as culturas 2D continuam a ser muito atraentes para fins laboratoriais, devido à sua simplicidade, conveniência e baixo custo (KUPHAL; HAASS, 2011).

Na década de 1970 pesquisadores buscavam desenvolver modelos de cultura de células tridimensional (3D) a fim de reduzir o uso de animais em pesquisas e as incertezas experimentais provenientes da cultura 2D (LIN; CHANG, 2008; ONG et al., 2018). Quando comparados à cultura 2D, o ambiente dinâmico 3D apresenta a vantagem de mimetizar melhor o microambiente celular *in vivo*, proporcionando condições fisiológicas e biológicas mais realistas (tabela 3) (KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015). Além de ser uma ferramenta importante para o teste de drogas e toxicidade (MEHTA

et al., 2012) e fornecem a base para a geração de construção de tecidos artificiais no campo da biotecnologia e engenharia de tecidos (LASCHKE; MENGER, 2017).

Tabela 3: Principais diferenças entre cultura 2D e 3D.

	2D	3D
Morfologia	Forma alterada Ausência de polarização	Forma real Polarização conservada
Perfil genético	Adesão celular, proliferação e genes relacionados a sobrevivência são modificados em comparação com in vivo	Melhor representação dos fatores de crescimento, genes pró-angiogênese e de moléculas de adesão
Diferenciação celular Morfogênese	Não espontânea	Pode ser espontânea via contato celular
Angiogênese	Apenas observacional	Pode ser funcional
Heterogeneidade tumoral	Básico	Melhor aproximação via gradiente de proliferação
Modelo matemático	Possível	Melhor geometria, melhor ligação entre estrutura e função
Reprodutibilidade	Apenas a curto prazo	Controverso
Custo	Acessível	Mais caro, especialmente em algumas técnicas
Estudo multicelular	Melhor quando o estudo é em relação a resposta imune	Bom em co-cultura, mas complicado com mais de dois tipos de células

O sistema de cultura de células 2D resulta em atividades celulares que são diferentes as resposta observadas in vivo. A cultura de células 3D ajuda contornar essas limitações, preservando a forma original da morfologia, polarização, perfil genético e heterogeneidade de células. Adaptada de HOARAU-VÉCHOT et al., 2018.

Utilizar cultura 3D envolve a formação de esferóides. Os esferóides são agregados de células e a sua formação baseia-se no princípio da automontagem (LASCHKE; MENGER, 2017; HOARAU-VÉCHOT et al., 2018). Johannes Holtfreter (1944) e Aron Arthur Moscona (1952) foram os primeiros pesquisadores a desenvolverem esse modelo de cultura celular utilizando a formação de esferóides por meio do processo de suspensão celular (LIN; CHANGE, 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células se juntam sem qualquer influência externa. Este processo de auto-organização também ocorre *in vitro* desde que as células não possam se conectar a uma superfície de biomateriais e, portanto, são forçadas a interagir uma com a outra (ACHILLI et al., 2012; LASCHKE; MENGER, 2017). O processo de formação dos esferóides é composto por 3 fases: 1) células dispersas são

inicialmente agregadas através da ligação da integrina (molécula de adesão) com a matriz extracelular; 2) expressão da molécula de adesão caderina para continuar promovendo a adesão entre as células; 3) compactação do esferóide devido a ligação homofílica caderina-caderina, conferindo forte adesão entre as células (figura 12) (LIN; CHANG, 2006).

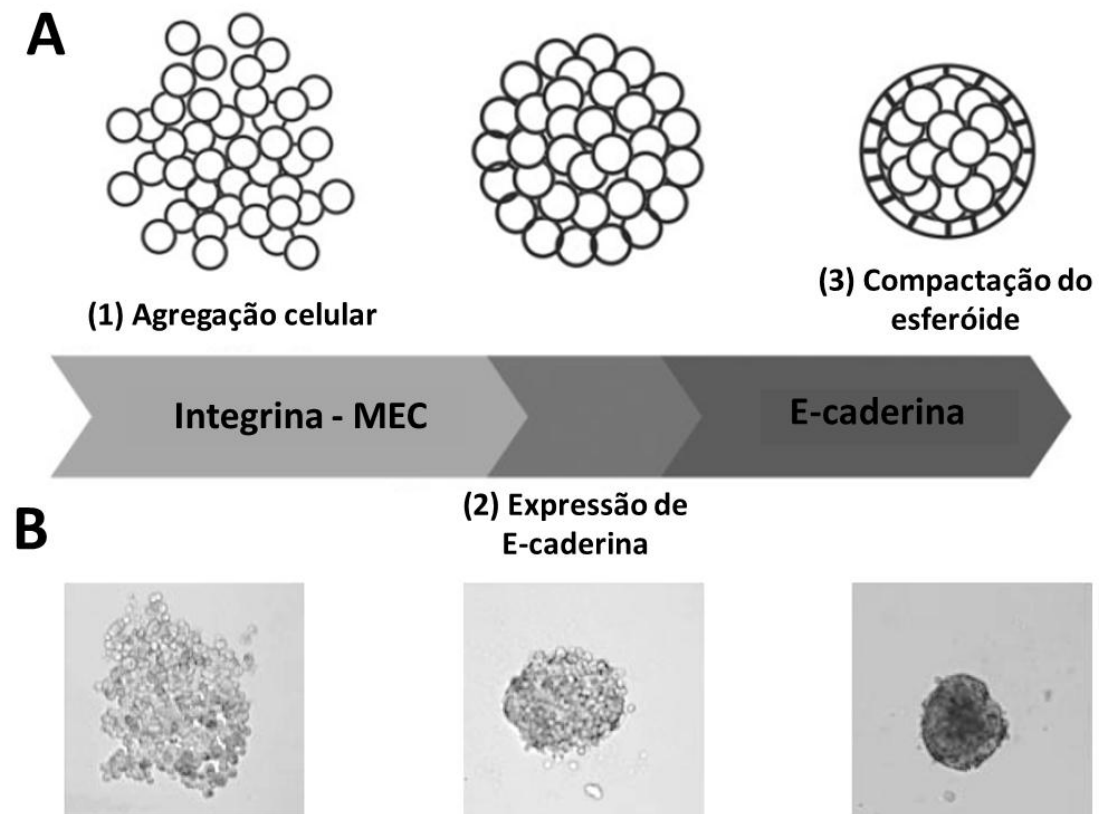


Figura 12: Modelo do processo de formação dos esferóides. Esquema (A) e fotomicrografia (B) representando os três estágios da formação dos esferóides: (1) formação de uma pequena agregação celular via ligação integrina-matriz extracelular; (2) período de expressão de caderina, aumentando a ligação célula-célula; (3) compactação do esferóide. Adaptado de LIN; CHANG, 2008.

Como resultado de sua estrutura 3D, os esferóides apresentam propriedades biológicas mais semelhantes com o modelo *in vivo* quando comparado com a cultura 2D, tais como: melhor viabilidade celular, morfologia estável e polarização, aumento da atividade proliferativa, função metabólica e fisiológica (figura 13). (LASCHKE; MENGER, 2017).

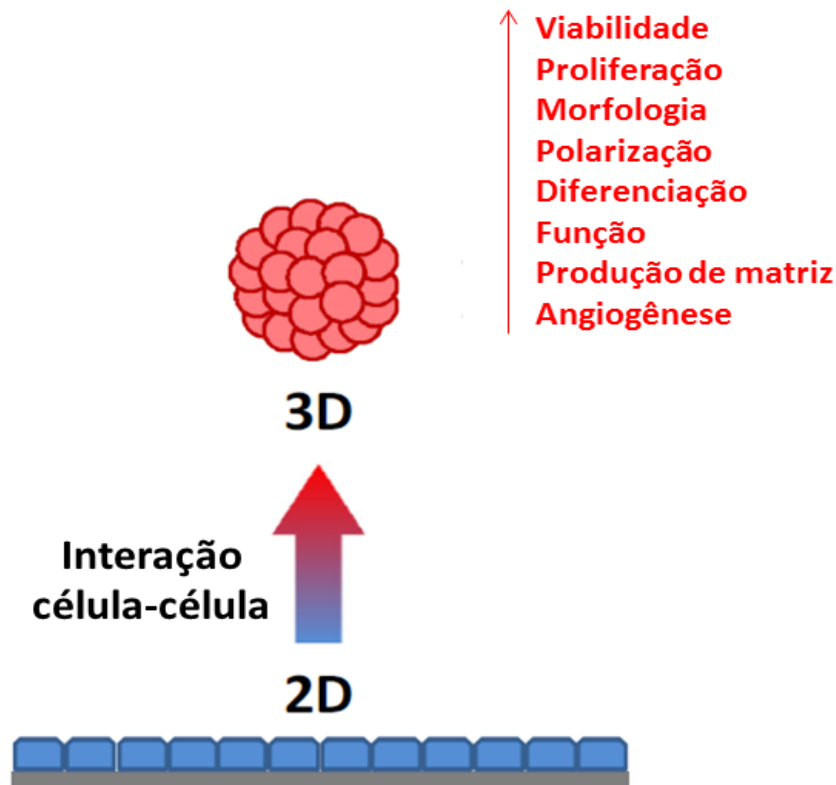


Figura 13: Estrutura 3D dos esferóides e suas propriedades quando comparadas com a estrutura 2D. Como resultado da interação célula-célula, os esferóides exibem um painel de propriedades biológicas que são melhores quando comparadas com as células em 2D. Adaptado de LASCHKE; MENGER, 2017.

Os esferóides estão cada vez mais sendo empregados para responder a uma ampla gama de pesquisas que vão desde a farmacologia até a fisiopatologia da doença. A utilização dos esferóides como ensaios e modelos para compreender doenças como o câncer e para testar drogas terapêuticas tem sido amplamente aplicada (ONG et al., 2018). Os esferóides formados a partir de células tumorais são usados como modelo *in vitro* para mimetizar a complexidade dos tumores, pois o seu microambiente reflete ao que é observado *in vivo* (ACHILLI et al., 2012; LEVESQUE et al., 2014).

A complexidade do microambiente tumoral *in vivo* que o esferóide mimetiza consiste na interação célula-célula, interação célula-matriz extracelular, distribuição espacial de oxigênio, metabólitos e moléculas de sinalização que não podem ser reproduzidos em culturas 2D (ACHILLI et al., 2012; LASCHKE; MENGER, 2017). O microambiente tumoral é composto além das células cancerígenas, por diferentes tipos de células não

cancerígenas e seu estroma, como fibroblastos, células do sistema imune (linfócitos e macrófagos), células mesenquimais e células endoteliais, que têm um papel específico na fisiologia, estrutura e função do tumor (figura 14) (PIETRAS; OSTMAN, 2010; HE et al., 2018). Essas interações geram sinalizações necessárias para a ativação de fatores de transcrição que induzem a expressão de genes que promovem a proliferação e migração celular (HOARAU-VÉCHOT et al., 2018).

O microambiente tumoral não é composto apenas de componentes celulares, mas também de substância bioativas, incluindo hormônios, componentes de matriz extracelular, quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. Além disso, sabe-se que a composição e as características do microambiente tumoral variam dependendo do local do tumor (MBEUNKU; JOHANN, 2009).

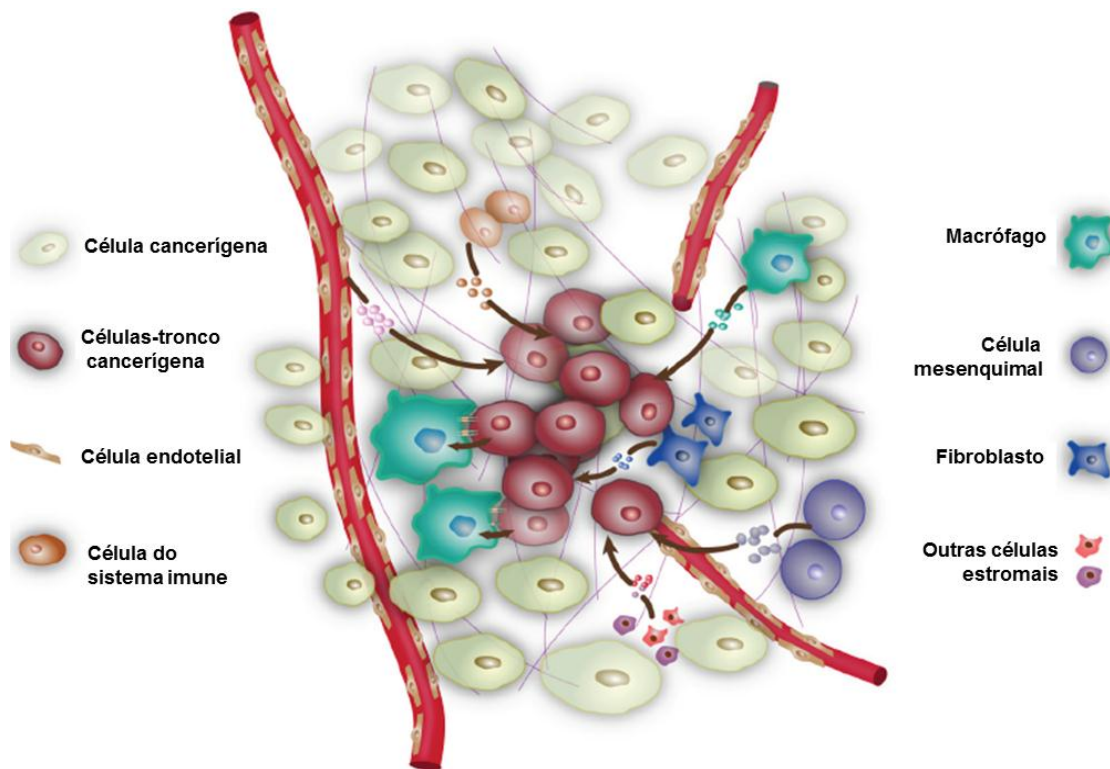


Figura 14: Esquema microambiente tumoral. O microambiente tumoral é composto por células cancerígenas e não-cancerígenas, tais como: célula endotelial, células do sistema imune, macrófago, célula mesenquimal, fibroblasto e outras células estromais. Adaptado de HE et al., 2017.

Estudos indicam que o esferóide é análogo a um tumor avascular, apresentando limitação de difusão para muitas moléculas. Portanto, um pré-requisito principal é a fabricação de alto padrão de esferóides de tamanho e composição definidos. Dependendo das necessidades do pesquisador e do método utilizado, é possível obter esferóide de qualquer dimensão. Porém, como o nível de oxigênio e nutrientes é menor no núcleo devido à densidade celular e ao aumento de matriz extracelular, o tamanho total dos esferóides não deve exceder algumas centenas de micrômetros para evitar dano necrótico no núcleo (FRIEDL; ALEXANDER, 2011; VINCI et al., 2012; LASCHKE; MENGER, 2017). Um esferóide acima de 500 μm de diâmetro exibe uma estrutura semelhante ao observado em tumores sólidos *in vivo* e são caracterizados por uma zona de proliferação externa, uma zona quiescente interna causada pela distribuição limitada de oxigênio, nutrientes e metabólitos, e um núcleo necrótico (figura 15) (ALVAREZ-PÉREZ et al., 2005; DE SOUSA E MELO et al., 2013). Este ambiente complexo garante a sobrevivência celular e determina crucialmente as funções celulares fundamentais, tais como expressão gênica, proliferação, diferenciação e atividade metabólica (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2012; ZANONI et al., 2016; LASCHKE; MENGER, 2017).

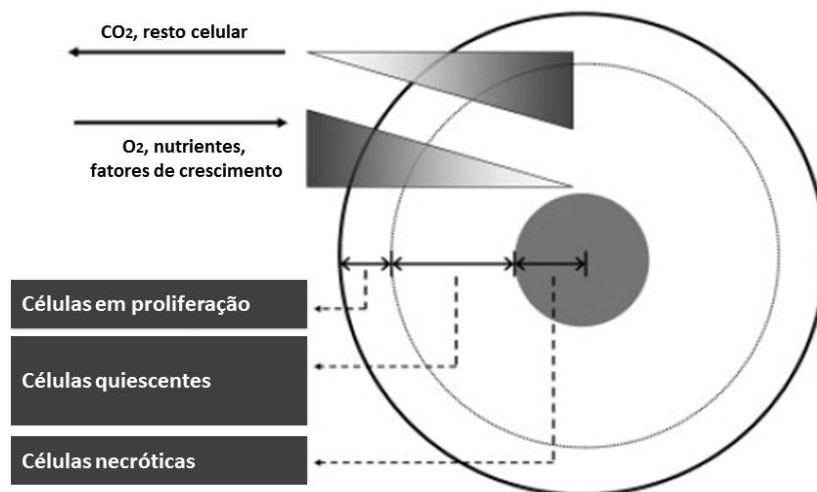


Figura 15: Esquema da organização do esferóide. Na região mais externa encontram-se as células em proliferação. Logo em seguida está uma região marcada pelas células quiescentes. Na camada interna do esferóide localizam-se as células necróticas. A concentração de nutrientes e oxigênio (O_2) é maior na região mais externa. Do contrário, restos celulares e dióxido de carbono (CO_2) são encontrados em maior concentração na região central do esferóide. Ambos formam um gradiente de concentrações. Adaptado de LIN; CHANG, 2008.

Os esferóides podem ser formados a partir de um tipo de célula ou como esferóide de co-cultura, fazendo a combinação de diferentes tipos de células. A formação dos esferóides consiste na modificação da superfície de cultura celular, promovendo a agregação das células (GU et al., 2013). Várias técnicas de formação de esferóides foram desenvolvidas, podendo ser divididas nas seguintes categorias: (i) método de gota suspensa; (ii) métodos de superfície não aderentes; (iii) cultura em suspensão; (iv) métodos baseados em scaffolds; (v) levitação magnética (figura 16) (ZANONI et al., 2016).

A técnica de cultura de gotas suspensas foi originalmente um método de microbiologia usado para estudar bactérias em um ambiente confinado e controlado (RAGHAVAN et al., 2015). Nesta técnica, as gotas de suspensões celulares são colocadas na parte inferior de uma tampa da placa de Petri (figura 16A). A tampa, onde as células pendem devido à tensão superficial, é então colocada sobre uma placa de Petri, que contém PBS (solução salina tampão fosfato) ou água para evitar a desidratação das gotas. A microgravidade do ambiente permite que em cada gota as células se ajuntam na interface ar-líquido, agregando-se espontaneamente e formando os esferóides. Em geral, o método de gotas suspensas é bastante simples e consistente. Além disso, pode produzir um esferóide por gota para cada linhagem celular diferente (TUNG et al., 2011; HSIAO et al., 2012; RAGHAVAN et al., 2015).

O método de cultura celular de superfície não aderente consiste na utilização de placas de fixação ultra baixas, o que evita que as células se liguem à superfície dos poços, induzindo as células agregarem entre si e formar o esferóide (figura 16B). Alternativamente, o material de cultura pode ser feito sem a capacidade não-aderente da superfície. Neste caso, a placa é revestida com um substrato, como por exemplo, agarose. Essa técnica espontânea de formação de esferóides é fácil de usar e permite um alto rendimento de esferóides (placas de 96 ou 384 poços). Os esferóides podem ser cultivados por um longo período de tempo e podem ser recuperados após a cultura para utilização subsequente (LIN & CHANG, 2008; HOARAU-VÉCHOT et al., 2018).

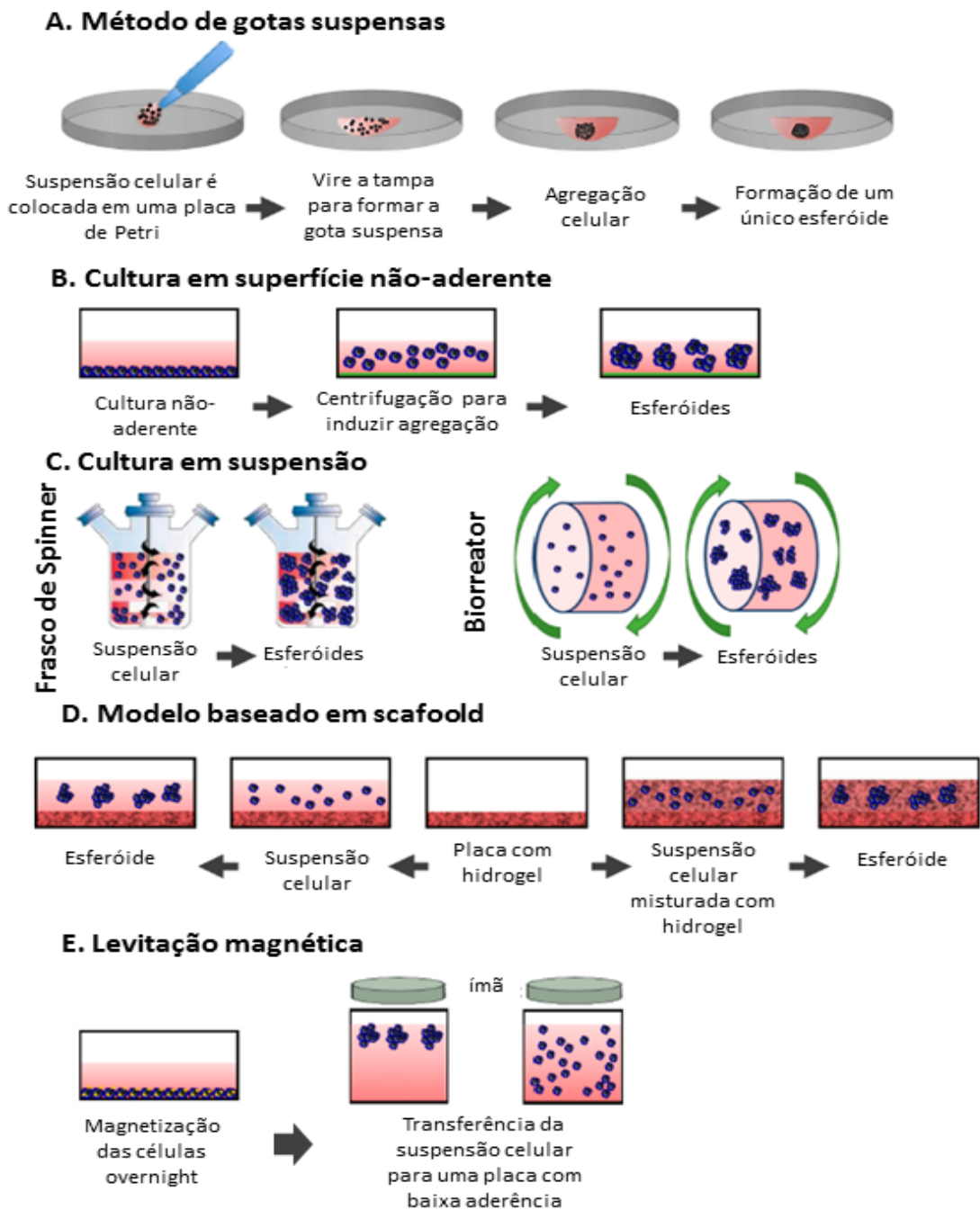


Figura 16: Técnicas mais comuns utilizadas para a formação de esferóide. (A) método de gotas suspensas. As células são depositadas em uma tampa de placa de Petri, que é invertida sobre uma placa de Petri contendo PBS ou água; (B) cultura em superfície não-aderente. As células são semeadas em uma placa de fixação ultra-baixa que impede a adesão; (C) cultura em suspensão. As células são colocadas em frascos giratórios (esquerda) ou biorreatores (direita) e submetidas a forças gravitacionais; (D) modelo baseado em scaffold. As células são semeadas acima do hidrogel (esquerda) ou misturada a ele (direita); (E) levitação magnética. As células são magnetizadas em cultura e atraídas por um ímã. Adaptado de HOARAU-VÉCHOT et al., 2018.

O princípio do método de cultura em suspensão é manter as células em suspensão em um recipiente por agitação ou pela giração suave (figura 16C). Agitar as células continuamente as impendem de aderir às paredes do recipiente e promove a interação célula-célula. Dois aparelhos principais são utilizados neste método: frascos de Spinner e biorreatores (HOARAU-VÉCHOT et al., 2018). Os frascos de Spinner consistem num recipiente no qual contém uma barra de agitação que permite a rotação da suspensão celular. Este método simples produz grandes rendimentos de esferóides. No entanto, a força resultante do movimento da barra de agitação pode modificar a fisiologia celular (NYBER et al., 2005; LIN; CHANG, 2008).

Na tentativa de superar este problema, a Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço (NASA) projetou os biorreatores, um sistema de cultura celular rotativo melhorado para criar um ambiente de microgravidade único com baixa força (SCHWARZ et al., 1992). Os biorreatores são semelhantes aos frascos giratórios (Spinner), mas ao invés de promover a rotação da suspensão celular com uma barra de agitação, o recipiente de cultura é girado. Da mesma forma que os frascos de Spinner, os biorreatores não permitem o controle do tamanho dos esferóides (HIRSCHHAEUSER et al., 2009).

Os esferóides também podem ser formados pelo método que utiliza scaffolds que fornecem suporte para a auto-montagem das células. Os hidrogéis naturais ou sintéticos são os mais utilizados como scaffolds, a fim de recapitular o papel da matriz extracelular *in vivo* (CALIARI; BURDICK, 2016). Entre os mais comuns, destacam-se os hidrogéis derivados naturalmente (por exemplo, colágeno, fibrina e alginato), sintéticos (por exemplo, polietilenoglicol [PEG]) e alguns hidrogéis semi-sintéticos que apresentam uma combinação de polímeros sintético e naturais (por exemplo, hialuronano) (TOKUDA et al., 2017).

Na técnica que utiliza hidrogéis como matrizes, as placas de cultura celular são pré-revestidas com hidrogel. Após a solidificação, a parte superior da matriz é revestida por células. Esse sistema é mantido sob agitação para permitir que as células aderem uma à outra e formem os esferóides (figura 16D). O uso de hidrogéis é de grande interesse porque eles apresentam composição e estrutura semelhante a tecidos *in vivo*. Por

outro lado, ao usar hidrogéis naturais, pode haver fatores de crescimento endógenos que não representam o microambiente tumoral humano (KLEINMAN; MARTIN, 2005; HOARAU-VÉCHOT et al., 2018).

A técnica de levitação magnética foi desenvolvida pela primeira vez por Souza e colaboradores em 2010 que utilizaram hidrogéis contendo nanopartículas de ouro e óxido de ferro magnético. Neste método, as células são incubadas overnight com hidrogel contendo óxido de ferro magnético. Posteriormente, as células são colocadas em uma placa de fixação ultra baixa e uma tampa com ímã é colocada sobre a placa (figura 16F). Os esferóides começam a se formar dentro de algumas horas na interface ar-líquido devido à levitação em relação ao ímã. Os esferóides formados podem ser incubados por alguns dias até atingir o tamanho ideal. Existem muitos benefícios para este método, tais como: a velocidade de formação do esferóide é alta em comparação com os outros métodos mais comumente usados; esferóides formam matriz extracelular intrínseca, sem a necessidade de andaimes artificiais; os esferóides formados apresentam diâmetro na escala de milímetros. No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, pois as esferas geralmente apresentam alto valor para compra e em alta concentração podem ser tóxicas para as células (SOUZA et al., 2010; TSENG et al., 2013; NATH; DEVI, 2016).

Cada método apresenta vantagens e desvantagens específicas (tabela 4). Portanto, os critérios gerais para a seleção de um método consistem na eficiência de produção, uniformidade de tamanho dos esferóides, capacidade de provocar possível dano ou influência na fisiologia celular, conveniência e adequação para aplicações subsequentes (LIN; CHANG, 2008).

Tabela 4: Vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas para formar esferoides.

Método	Vantagens	Desvantagens
Gotas suspensas	Barato Simples de executar Tamanho do esferóide bem controlado Formação rápida Co-cultura de diferentes tipos de células	Trabalho intensivo Produção maciça difícil
Superfície não aderente	Barato Execução simples	Varição em tamanho/número de células/forma
Cultura em suspensão	Simples de executar Produção maciça Cultura a longo prazo Co-cultura de diferentes tipos de células	Requer equipamento especializado Varição no tamanho/número de células Alta força de cisalhamento
Baseado em scaffold	Fornecer suporte extracelular 3D	Hidrogel natural pode haver fatores de crescimento endógenos que não representam o microambiente tumoral
Levitação magnética	Rápida formação de esferóide Matriz extracelular intrínseca	Caro Esferas magnéticas em alta concentração podem ser tóxicas para as células

Todo método utilizado para formar os esferoides apresenta vantagens e desvantagens. A escolha do método ideal deve levar em consideração uma produção eficiente de esferoides, com uniformidade de forma, tamanho e número de células, bem como a ausência de possíveis danos ou influência na fisiologia das células.

A heterogeneidade do tumor e a resistência das células tumorais aos quimioterápicos tem sido um desafio para o direcionamento efetivo dos sistemas de liberação de medicamentos para o sucesso da quimioterapia. Sendo assim, torna-se importante a busca de modelos que possibilitam compreender o comportamento da célula e do microambiente tumoral (SANCHEZ et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Analisar o perfil de expressão gênica dos transportadores ABC em cultura tridimensional de células de melanoma cutâneo humano.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar um modelo de cultura tridimensional que melhor representa o microambiente tumoral *in vitro* a partir de células de melanoma cutâneo humano das linhagens A-375 e SKMEL-37;
- Detectar a presença dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8 nos esferóides de células A-375 e SKMEL-37 por meio da técnica de RT-PCR;
- Quantificar os níveis de expressão gênica dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8 nos esferóides formados com linhagens celulares A-375 e SKMEL-37 por meio da técnica de RT-PCR em tempo real.

3. MÉTODOS

O Fluxograma da Figura 17 apresenta, de forma resumida, a metodologia adotada no desenvolvimento deste estudo.

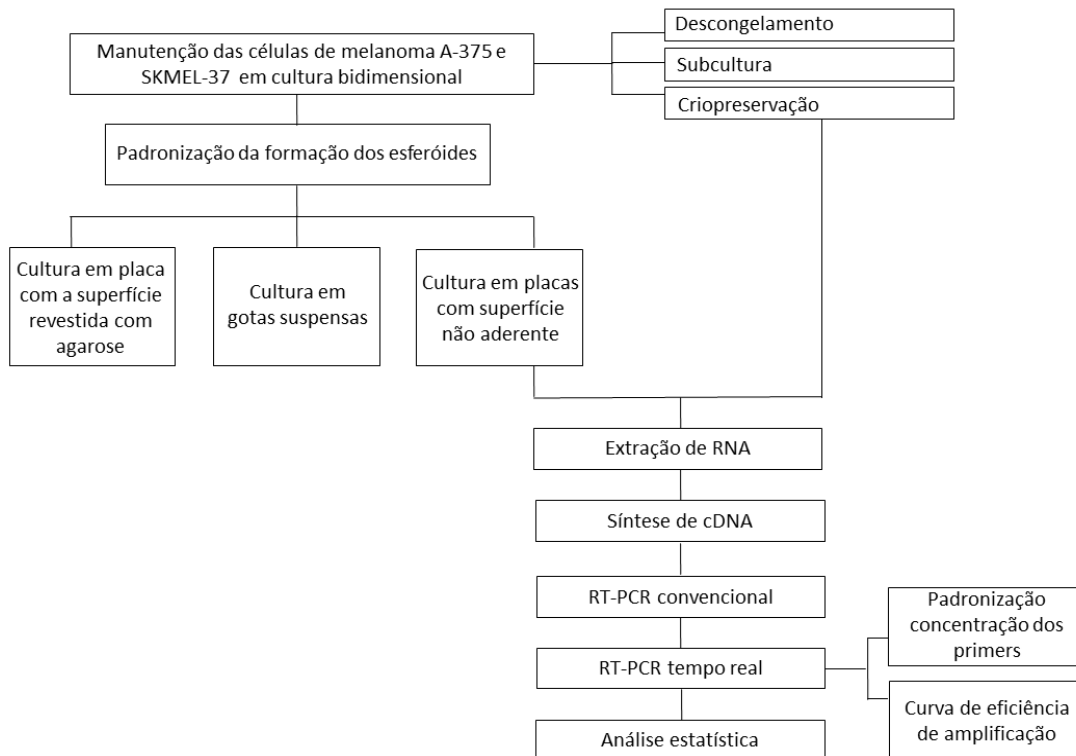


Figura 17: Metodologia utilizada na execução do presente estudo

3.1 Manutenção das células de melanoma em cultura celular bidimensional

Neste estudo foram utilizadas células de melanoma humano das linhagens SKMEL-37 (doadas pelo Dr. LJ Velha do Sloan-Kettering Cancer Center, NY, EUA) e A-375 (adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro). Essas células foram mantidas em cultura bidimensional, para que posteriormente fossem utilizadas para a formação dos esferóides.

3.1.1 Descongelamento das células de melanoma humano

As células de melanoma humano das linhagens SKMEL-37 e A-375 foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Logo após, adicionou-se meio MEM [*Minimum Essential Media* (Vitrocell-Embriolife, Campinas, Brasil)] e DMEM [*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco-Life Technologies, USA)] contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-Invitrogen, USA) nos frascos das células SKMEL-37 e A-375, respectivamente. As células foram centrifugadas a 3.000 xg por 3 minutos, desprezando-se a seguir o sobrenadante. A ressuspensão das células foi realizada em meio de cultura, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina (Gibco-Invitrogen, USA) e 0,25 µg/mL de Fungizona (Gibco-Invitrogen, USA). As células foram transferidas para frascos de cultura de 75 cm² (Orange Scientific) e mantidas a 37°C em incubadora úmida com 5% de CO₂.

3.1.2 Subcultura celular

As células foram periodicamente observadas em microscópio de luz invertida (Eclipse TE 2000S, NIKON). Ao atingirem confluência, o meio de cultura foi removido e a lavagem foi realizada com solução salina tamponada com fosfato [DPBS (Gibco-Invitrogen, USA)] pH= 7,0, a fim de remover o meio de cultura restante. Em seguida, as células foram dissociadas por tratamento com 0,05% de solução tripsina/EDTA (Cultilab, Campinas, Brasil). Adicionou-se meio de cultura contendo 10% de SFB para inativar a ação da tripsina e as células foram centrifugadas a 300 xg por 3 minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado e as células SKMEL-37 e A-375 foram ressuspendidas em meio de cultura MEM e DMEM, respectivamente, contendo 10% de SFB, 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina e 0,25 µg/mL de Fungizona. As células foram semeadas em novos frascos até atingirem novamente a confluência e número suficiente para experimentos. Alíquota de células era retirada para contagem no Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck Millipore, Alemanha).

3.1.2 Criopreservação

Quando necessário, alíquotas de células foram congeladas utilizando meio de congelamento de células com DMSO [Dimetilsulfóxido (EmbryoMax, Chemicon)]. Após a dissociação por intermédio da tripsina, as células foram centrifugadas a 3.000 xg por 3 minutos. A ressuspensão foi realizada em 1,0 mL de meio de congelamento. As células foram acondicionadas em criotubos, que permaneceram por cerca de 24 horas à -20°C e posteriormente foram transferidos para o nitrogênio líquido (-196°C).

Além disso, células A-375 e SKMEL-37 foram congeladas para posteriormente serem utilizadas na extração de RNA. Para isso, após dissociação pelo uso da tripsina, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi retirado. O pellet foi armazenado em um eppendorf a -20°C.

3.2 Padronização da formação dos esferóides

A fim de formar esferóides uniformes em tamanho, forma e número de células, utilizamos neste estudo três diferentes métodos, sendo eles: cultura em placa com a superfície revestida com agarose, cultura em gotas suspensas e cultura em placas com superfície não aderente.

3.2.1 Cultura em microplaca com a superfície revestida com agarose

Inicialmente, o pó de agarose (Invitrogen) foi dissolvido em água destilada (1%) e autoclavado por 15 minutos. Posteriormente, esta solução foi mantida em banho-maria à temperatura de 60°C para manter o gel em estado líquido. Uma placa estéril de 96 poços com fundo redondo (Nunc, Thermo Scientific) foi utilizada neste procedimento. Ainda no estado líquido, utilizou-se 100 µl do gel de agarose para revestir cada poço da microplaca. Para isso, o volume era adicionado e removido logo em seguida. Em alguns poços da microplaca, adicionou-se 50 µl do gel de agarose e não removeu.

A microplaca foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente para completa polimerização do gel de agarose.

Logo após, foi realizada a padronização da densidade celular para o cultivo 3D. Nesta ocasião, foram utilizadas apenas as células de melanoma da linhagem SKMEL-37 que foram cultivadas nas seguintes densidades: 2×10^3 , 4×10^3 , 2×10^4 e 4×10^4 células/poço (figura 18). Após a contagem de células utilizando o Scepter™ 2.0 Cell Counter, essas foram transferidas para cada poço da microplaca em 100 μ l de meio MEM suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina e 0,25 μ g/mL de Fungizona. A microplaca foi mantida em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37°C e o processo de formação dos esferóides foi acompanhado por um período de 21 dias utilizando o microscópio de luz invertida para análise do tamanho e forma. Além disso, a cada 72 horas de incubação o meio de cultura era trocado por um novo meio fresco. Para isso, eram retirados 50 μ l do volume de meio de cultura cada poço e adicionava-se 50 μ l de novo meio MEM suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina e 0,25 μ g/mL de Fungizona.

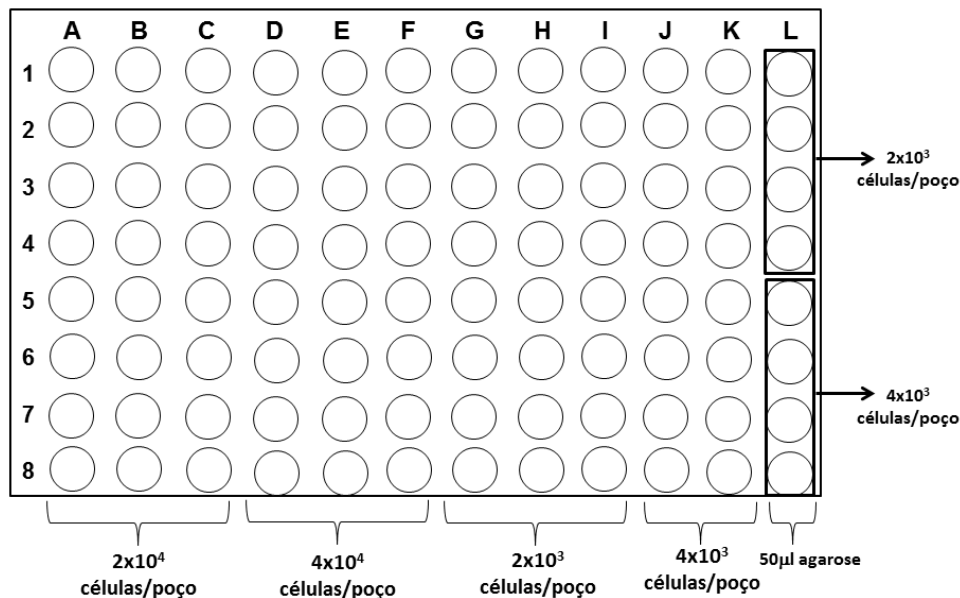


Figura 18: Esquema da microplaca de 96 poços com fundo redondo revestido com agarose, utilizada para a formação dos esferóides de células de melanoma humano da linhagem SKMEL-37. Os poços das fileiras A-K da placa foram revestidos com 100 μ l do gel de agarose, enquanto os poços da fileira L foram incubados com 50 μ l de agarose. Foram utilizadas nesta técnica quatro densidades celulares (2×10^3 , 4×10^3 , 2×10^4 e 4×10^4 células/poço). A placa foi mantida por um período de 21 dias em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂.

3.2.2 Cultura em gotas suspensas

Células de melanoma humano das linhagens A-375 e SKMEL-37 foram cultivadas em gotas suspensas utilizando a placa Perfecta3D™ Hanging Drop 96-well (3D Biomatrix, Inc., Ann Arbor, EUA) (figura 19A). Uma suspensão celular de 40 µl contendo 7×10^3 células foi dispensada em cada poço da placa (figura 19B,C). Adicionou-se água destilada nos reservatórios da placa para manter a umidade do sistema e evitar a evaporação da gota (figura 19D).

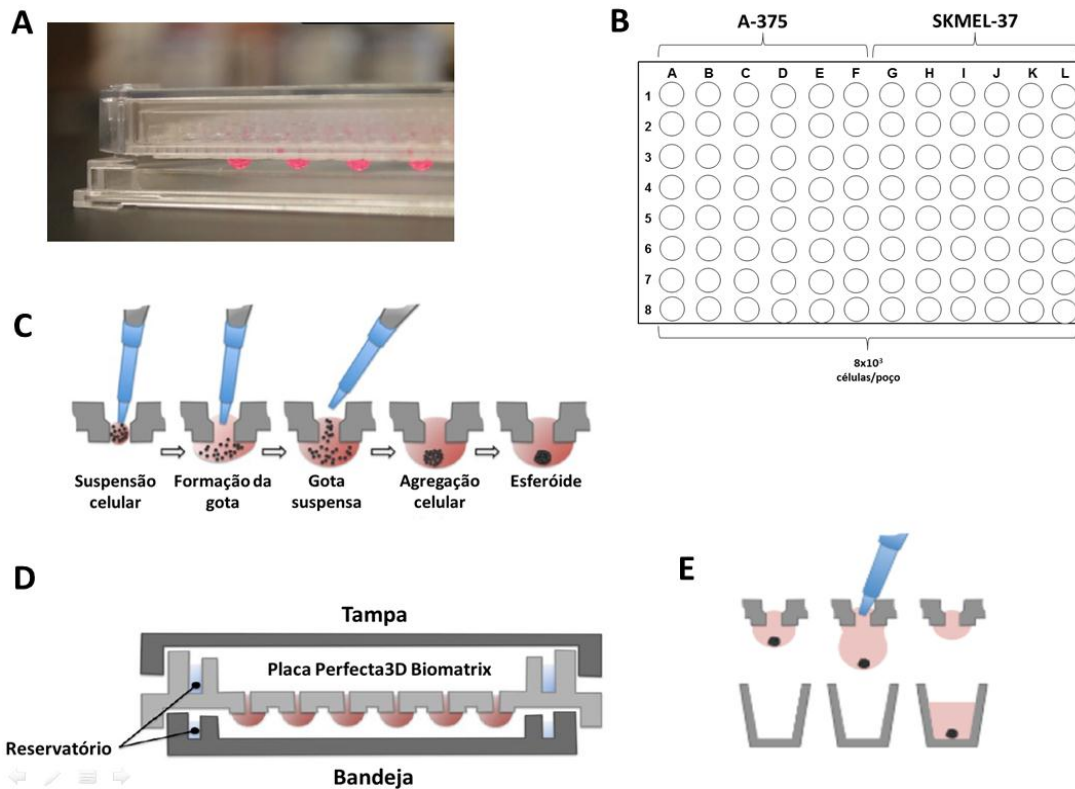


Figura 19: Formação dos esferóides em cultura de gotas suspensas de células de melanoma humano das linhagens A-375 e SKMEL-37, utilizando a placa Perfecta3D™ Hanging Drop 96-well. (A) imagem da gota em suspensão na placa Perfecta 3D Biomatrix; (B) esquema da distribuição na placa das células A-375 e SKMEL-37 na densidade de 7×10^3 ; (C) representação do processo de formação dos esferóides utilizando a técnica de gotas suspensas na placa Perfecta3D Biomatrix. A suspensão celular é dispensada no poço da placa, formando a gota. Essa gota ficará em suspensão, permitindo então a agregação das células, formando um esferóide por gota; (D) esquema do sistema da placa Perfecta3D Biomatrix constituído pela tampa, placa com os poços, reservatório laterais para adição de água e bandeja; (E) representação do método de transferência do esferóide para uma placa receptora.

As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por um período de 07 dias. No 3º dia de incubação, 5,0 µl do meio de cultura foi removido e adicionou-se 7,0 µl de meio de cultura fresco a cada gota. Após os 07 dias de incubação, os esferóides foram transferidos para uma placa estéril de 96 poços com fundo redondo (Nunc, Thermo Scientific) revestido com agarose (1%) para completa maturação. Para realizar essa transferência, emparelhou a placa Perfecta3D Biomatrix à placa de 96 poços e adicionou-se 100 µl de meio em cada poço da placa Perfecta3D Biomatrix para transferir as gotas contendo o esferóide para a placa receptora (figura 19E). Após a transferência, os esferóides ficaram incubados por mais 72 horas.

3.2.3 Cultura em placas de superfície não aderente

Para essa técnica, utilizou-se a placa Nunclon Sphera 96-poços (GIBCO, ThermoFischer Scientific). Essa placa possui poços com fundo redondo e sua superfície apresenta fixação ultra-baixa, promovendo assim a formação de esferóides consistentes. Uma suspensão celular de melanoma humano das linhagens A-375 e SKMEL-37 foi transferida para duas placas Nunclon Sphera nas densidades de 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e 4×10^4 em 200 µl de meio MEM (células SKMEL-37) e DMEM (células A-375) suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina e 0,25 µg/mL de Fungizona, conforme esquematizado na figura 20. As placas foram centrifugadas a 250 xg por 5 minutos e posteriormente incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

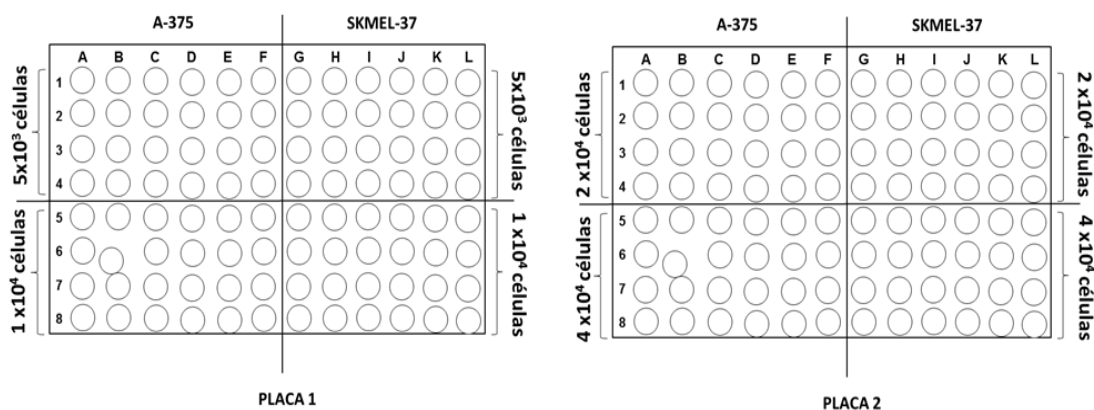


Figura 20: Esquema da distribuição das células A-375 e SKMEL-37 nas placas Nunclon Sphera. Foram utilizadas duas placas Nunclon Sphera. Na placa 1 foram adicionadas as células A-375 e SKMEL-37 nas densidades 5×10^3 e 1×10^4 , enquanto que na placa 2 foram adicionadas 2×10^4 e 4×10^4 células em $200 \mu\text{l}$ de meio em cada poço.

A formação e crescimento dos esferóides foram observados através do microscópio de luz invertida. Para o processo de formação dos esferóides da placa 1 (5×10^3 e 1×10^4 células/poço) foram necessários 03 dias de incubação, após a transferência da suspensão celular para os poços da placa. Posteriormente a formação dos esferóides, estes foram incubados por mais 07 dias. Os esferóides que foram formados e mantidos na placa 2 (2×10^4 e 4×10^4 células/poço) ficaram incubados por um período de 07 dias. Em ambas as placas, a cada 48 horas de incubação, $100 \mu\text{l}$ de meio de cultura eram removidos de cada poço da placa e adicionava-se $100 \mu\text{l}$ de meio de cultura fresco.

Após o período de 03 dias para a formação dos esferóides na placa 01, esses foram retirados da placa Nunclon Sphera e transferidos para um eppendorf. No 4º e 7º dia após a formação dos esferóides, estes também foram transferidos para um eppendorf (figura 21) e centrifugados. O pellet foi armazenado no freezer a -20°C para futura extração de RNA. Já os esferóides formados na placa 02, foram utilizados em outras técnicas no laboratório.

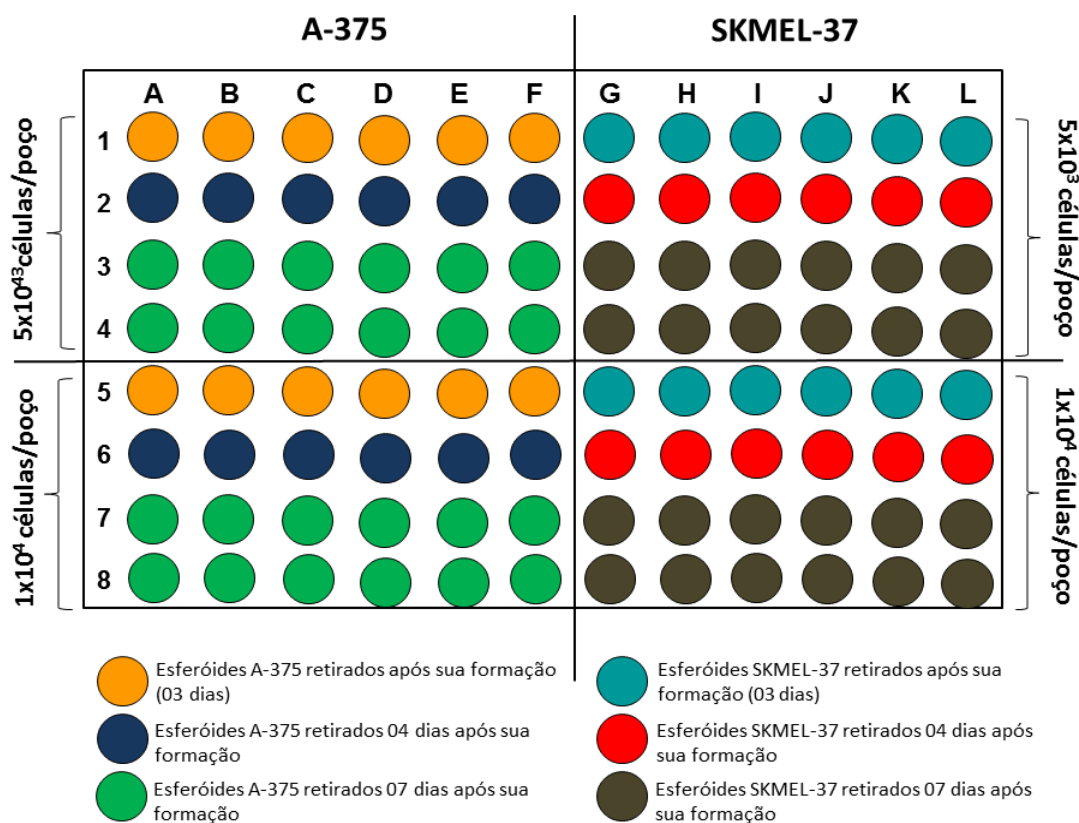


Figura 21: Esquema dos períodos de incubação dos esferóides formados na placa Nunclon Sphera (placa 1). Nesta ocasião, 05 esferóides de cada densidade e linhagem celular (5×10^3 e 1×10^4 células A-375 e SKMEL-37) foram retirados logo após sua formação (03 dias de incubação). Os demais esferóides continuaram em manutenção para crescimento e foram retirados com 04 e 07 dias após sua formação, e transferidos para eppendorfs. Esses foram centrifugados e o pellet dos esferóides foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.4 Extração do RNA das amostras

A extração do RNA das amostras foi realizada utilizando o kit comercial RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Os esferóides formados na placa Nunclon Sphera (placa 1) foram descongelados, centrifugados a 5,000 rpm por 1 minuto e lisados em 350 μl de tampão RLT. Logo após, o lisado foi transferido para uma coluna eliminadora de gDNA acoplada a tubo coletor de 2 mL, sendo centrifugado a 10.000 rpm por 30 segundos. A este volume foram adicionados 350 μl de etanol 70% e os 700 μl resultantes foram transferidos para uma nova coluna RNeasy spin inserida em um tubo de coleta de 2 mL. Efetuou-se uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 15 segundos, sendo o filtrado descartado. Em seguida, foram adicionados 700

μl de tampão RW1 na coluna e centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 segundos para lavar a membrana da coluna. O filtrado foi descartado e adicionou-se 500 μl de tampão RPE na coluna. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 segundos, descartou o filtrado e mais uma vez adicionou-se 500 μl de tampão RPE. A coluna foi centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos e posteriormente transferida para um eppendorf de 1,5 mL. Foram adicionados 40 μl de água RNase-free à coluna e centrifugou-se por 1 minuto a 10.000 rpm. Por fim, a coluna foi descartada e o RNA foi quantificado no aparelho Qubit fluorometer (Invitrogen), seguindo as instruções do kit Quant-it RNA Assay (Qiagen). Após a quantificação, o RNA foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizamos apenas o RNA extraído dos esferoides formados com 1×10^4 células e empregamos o kit comercial ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Inicialmente calculou-se o volume necessário correspondente à 132 ng de RNA para cada amostra. Essa alíquota foi então transferida para um tubo eppendorf contendo: 1 μl de primer, 2 μl de 10 mM dNTPmix e ajustou o volume para 12 μl com água DEPC-treated. Posteriormente, fez a denaturação do RNA e primer, incubando as amostras a 65°C por 5 minutos em um termociclador (Analítica). Em seguida, foi adicionado em cada tubo o master mix contendo os componentes descritos no quadro 1:

Quadro 1: Componentes do master mix para a síntese de DNA complementar (cDNA)

Componentes	Volume dos componentes (μl)
cDNA Buffer	4,0
0,1 M DTT	1,0
RNase OUT	1,0
Água DEPC	1,0
Enzima ThermoScript	1,0
Volume final do mix: 8,0 μl	

Após adição do master mix em cada tubo, as amostras foram transferidas para o termociclador, sendo incubadas a 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. Logo após, foi adicionado 1 µl de RNaseH e incubou a 37° durante 20 minutos. O cDNA sintetizado de cada amostra foi armazenado a -20°C.

3.6 Reações de RT-PCR convencional

Para as reações de RT-PCR convencional (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), utilizamos o Master Mix para PCR convencional (Quatro G&P Ltda) o qual já contém: Taq DNA Polimerase recombinante, MgCl₂ e dNTPs em concentrações suficientes para reações de PCR com volume final de 50 µl, sendo necessário acrescentar apenas os primers e a amostra. A sequência dos primers para ABCB1, ABCB5, ABCB8 e GAPDH utilizadas neste estudo foram obtidas em Takenaka et al. (2013) e sintetizadas pela Invitrogen (quadro 2). Para as reações de RT-PCR, foram adicionados os seguintes componentes para uma reação: 45 µl Master Mix, 3 µl de cDNA e 2 µl primer (200 nM do Forward e 200 nM do Reverse), obtendo um volume final de 50 µl. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador seguindo as seguintes condições: denaturação inicial 94°C durante 5 minutos, seguida de incubação a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, por 35 ciclos.

Quadro 2: Sequência dos primers para os transportadores ABC (ABCB1, ABCB5 e ABCB8) e do gene constitutivo GAPDH utilizados na RT-PCR.

	Primer forward (5' a 3')	Primer reverse (5' a 3')	Tamanho do produto (pb)
ABCB1	CGTGGTTGGAAGCTAAGGGT	TGCTGCCAAGACCTCTTCAG	153
ABCB5	GGTGAAGGGCTGAAACTCA	CCTGGGCCCTAAAGGCTATG	188
ABCB8	TGCTCCGACAAGACATCACC	CCTGACACTGGCGAGACAAT	270
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC	276

3.7 Eletroforese em gel de agarose

A visualização dos amplicons foi feita através de eletroforese em gel de agarose (3,0%) em tampão TBE [Tris (100 nM), ácido bórico (90 nM) e EDTA (1 mM)]. Para ser aplicado no gel, utilizou-se apenas 25,0 µl do produto de PCR e 6,0 µl de tampão de amostra [Gel Red 5x com Bromofenol (Quatro G&P Ltda)]. Um poço foi reservado para aplicação do marcador de peso molecular 50 pb (EasyGene). O gene GAPDH foi empregado como controle da reação de PCR, uma vez que seus níveis não variam com as diferentes condições. As bandas foram visualizadas em um transiluminador UV (BioRad) através do software ImageLab.

3.8 Padronização da RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

A técnica qRT-PCR requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados ocorram com alta eficiência. A concentração dos primers e a concentração de amostra são duas condições importantes neste método. Diante disso, foram realizadas a padronização da concentração dos primers e a curva de eficiência da amostra.

As reações foram realizadas no equipamento iCycler IQ5 (BioRad), utilizando-se o corante fluorescente SYBR Green (MasterMix PCR Tempo Real – SYBR Green 2x, Quatro G P&D Ltda)

3.8.1 Padronização da concentração dos primers

A sequência dos primers utilizados para análise dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8, e do controle endógeno GAPDH, foram adquiridas no banco de dados da OriGene Technologies (www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs) e sintetizadas pela Invitrogen. A sequência dos primers utilizados neste experimento, bem como o número de acesso, encontram-se no quadro 3.

Quadro 3: Sequência dos primers dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8, bem como do controle endógeno GAPDH, utilizados na qRT-PCR.

	Primer forward (5' a 3')	Primer reverse (5' a 3')	Tamanho do produto (pb)	Número de acesso
ABCB1	GCTGTCAAGGAAGCCAATGCCT	TGCAATGGCGATCCTCTGCTTC	120	NM_000927
ABCB5	TTTGCCATATGCGGCAGGGTTTC	CAAAACGAGCGTTTCTCCGATGG	132	NM_001163941
ABCB8	CCTGCTTATCCTCTATGGTGTC	GCCCTGTCTTATTGGCGTCAAAG	158	NM_001282291
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	131	NM_001256799
PMCA4	CTCACCGAACTGACCTGTATCG	GGCTGTGTTGATGTTGTACCTG	157	NM_001001396

Para determinar a menor concentração de primer capaz de amplificar de forma adequada o cDNA das amostras, utilizou-se 1 ng do cDNA da amostra de células SKMEL-37 cultivadas em monocamada e 5 diferentes concentrações de cada sequência de primer (forward e reverse): 50, 100, 200, 300 e 400 nM (figura 22).

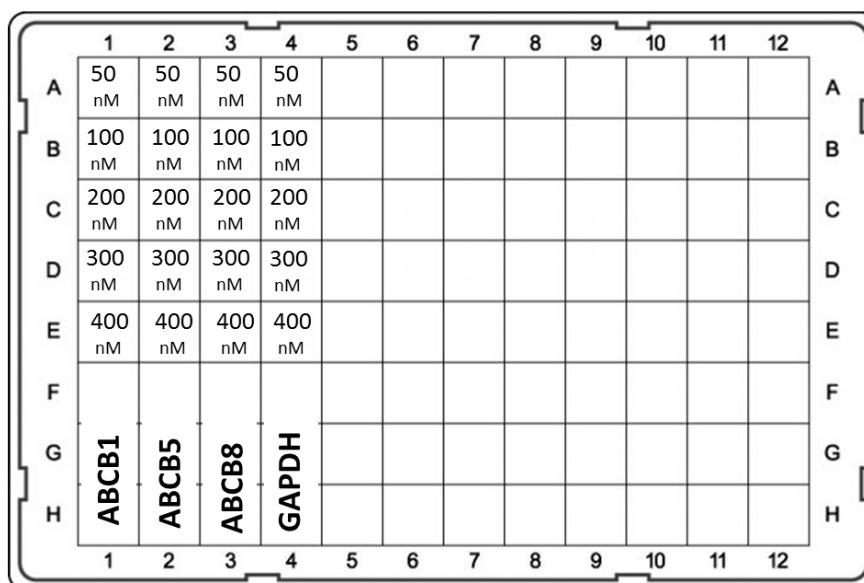


Figura 22: Esquema da placa utilizada na qRT-PCR para padronização da concentração de primer. Foram utilizadas 5 diferentes concentrações de cada primer (50, 100, 200, 300 e 400 nM) e 1 ng de cDNA sintetizado a partir do RNA das células SKMEL-37 cultivadas em monocamada.

As reações foram realizadas nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de

40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento/extensão (60°C por 1 minuto). Ao término da amplificação foi realizada a curva de dissociação (Melt curve) que consistiu em 81 ciclos, iniciando a 55°C por 30 segundos e a temperatura foi subsequentemente aumentada para 95°C em 0,5°C/segundo.

3.8.2 Curva de eficiência de amplificação do qRT-PCR

Após a determinação da concentração ideal de primer, utilizou-se a concentração de 100 nM para realizar uma curva padrão, a fim de verificar a eficiência de amplificação da reação. Para isso, foram utilizadas diferentes concentrações (10; 5; 2,5; 1,2; 0,6 e 0,3 ng) de cDNA da amostra de células SKMEL-37 cultivadas em monocamada (figura 23).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng									A
B	5 ng	5 ng	5 ng	5 ng									B
C	2,5 ng	2,5 ng	2,5 ng	2,5 ng									C
D	1,2 ng	1,2 ng	1,2 ng	1,2 ng									D
E	0,6 ng	0,6 ng	0,6 ng	0,6 ng									E
F	0,3 ng	0,3 ng	0,3 ng	0,3 ng									F
G	ABCB1	ABCB5	ABCB8	GAPDH									G
H													H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 23: Esquema da placa utilizada na qRT-PCR para realização da curva de eficiência de amostra. A amostra de cDNA das células SKMEL-37 cultivadas em monocamada foi diluída em 6 concentrações: 10; 5; 1,5; 1,2; 0,6 e 0,3 ng. As reações envolvendo esta amostra foram realizadas utilizando 100 nM de cada sequência de primer.

As reações foram realizadas seguindo as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e

anelamento/extensão (60°C por 1 minuto). Ao término das amplificações foi realizada a curva de dissociação (Melt curve) para que a especificidade das reações fosse garantida. Essa curva consiste em 81 ciclos, iniciando a 55°C por 30 segundos e a temperatura é subsequentemente aumentada para 95°C em 0,5°C/segundo.

A curva padrão é obtida pela regressão linear do valor do ciclo de amplificação C_T (*Cycle threshold*) sobre o log da quantidade inicial de cDNA. A eficiência de amplificação da reação é calculada conforme a equação: $E = 10^{(-1/\text{slope})} \times 100$. Um coeficiente angular da curva padrão de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência.

3.9 Reações de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

Após a padronização da concentração de primer e de amostra, foi realizada a qRT-PCR das amostras de cDNA dos esferóide formados na placa Nunclon Sphera (placa 01). Para a realização da qRT-PCR, foram utilizados os seguintes componentes: primer (100 nM de cada sequência), cDNA das amostras dos esferóides (1 ng), e o Master Mix contendo o corante fluorescente SYBR Green, Taq DNA Polimerase recombinante, MgCl₂ e dNTPs (Master Mix SYBR Green, Quatro G P&D Ltda), com volume final de reação 25,0 µl.

Foram realizados três experimentos independentes e as reações para cada primer foram feitas em duplicatas, sendo realizados também controles sem amostra (controle negativo) para avaliar possível contaminação dos reagentes com produtos de PCR, conforme indicado na figura 24.

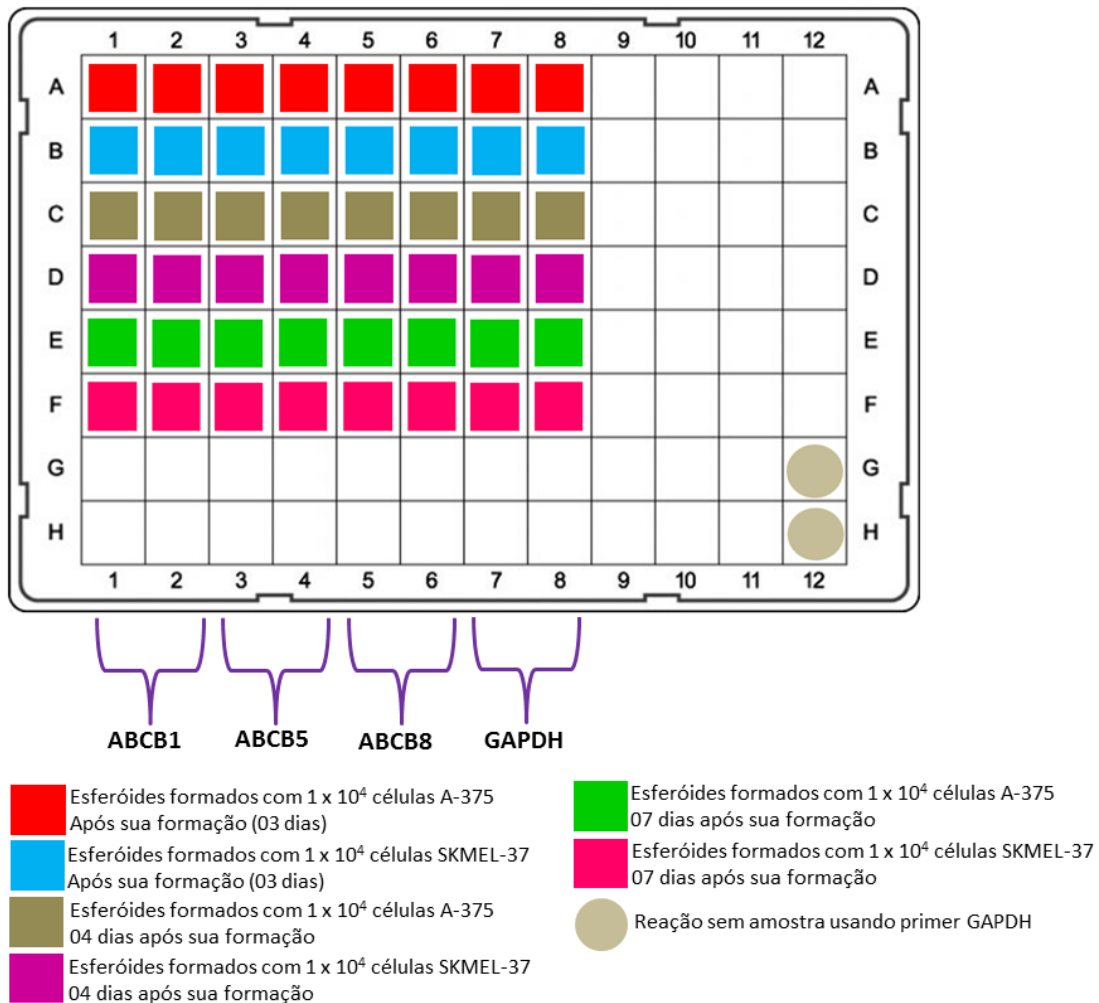


Figura 24: Representação esquemática da placa utilizada para as reações de qRT-PCR utilizando amostras de cDNA dos esferóides formados na placa Nunclon Sphera com 1×10^4 células das linhagens A-375 e SKMEL-37. Os esferóides foram retirados para análise logo após o período de sua formação (03 dias) e no 4º e 7º dia de crescimento. As reações foram feitas com 100 nM de primer e 1 ng de cada amostra, em duplicata para cada primer. Reações sem amostra usando o primer GAPDH foram realizadas para verificar possível contaminação.

As reações foram realizadas no equipamento iCycler IQ5 e as condições de ciclagens estão descritas na tabela 5. Ao término da amplificação, a curva de Melting foi realizada em 81 ciclos, iniciando a 55°C por 30 segundos e a temperatura foi subsequentemente aumentada para 95°C em $0,5^\circ\text{C}/\text{segundo}$, para garantir a especificidade da amplificação.

Tabela 5: Condições de ciclagem utilizada na qRT-PCR no equipamento iCycler IQ5.

Denaturação inicial	50°C 2 min 95°C 10 min
40 ciclos	
Denaturação	95°C 15 seg
Anelamento/extensão	60°C 1 min

Os valores quantitativos da expressão dos genes de interesse foram obtidos através da quantificação relativa. Os valores de Cycle Threshold (CT) de cada gene foram obtidos em duplicata em cada um dos três experimentos independentes, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas. Posteriormente, para cada experimento independente foi obtido o valor de ΔCT , $\Delta\Delta CT$ e fold change de cada gene de interesse, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\Delta CT = \text{média dos CT gene de interesse} - \text{média dos CT gene endógeno}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ amostra esferóide} - \text{média do } \Delta CT \text{ amostra tempo 0}$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.10 Análise estatística

Após a quantificação, os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos para determinar as possíveis diferenças estatísticas entre os períodos de incubação dos esferóides.

A análise dos dados foi realizada através de *One Way* ANOVA, seguida de pós-teste não paramétrico de Tukey.

As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 Padronização da técnica para formação dos esferoides

4.1.1 Cultura em microplaca com a superfície revestida com agarose

Células SKMEL-37 foram cultivadas em placas de 96 poços tratadas com agarose (1%) a fim de formar agregados tridimensionais (esferoides). Para isso, foram utilizadas quatro densidades celulares (2×10^3 , 4×10^3 , 2×10^4 e 4×10^4). O processo de formação e crescimento dos esferoides foi observado através de um microscópio de luz invertida e nos dias 11^o, 13^o, 15^o, 19^o e 21^o, foram obtidas as fotomicrografias desses esferoides, conforme apresentadas na figura 25.

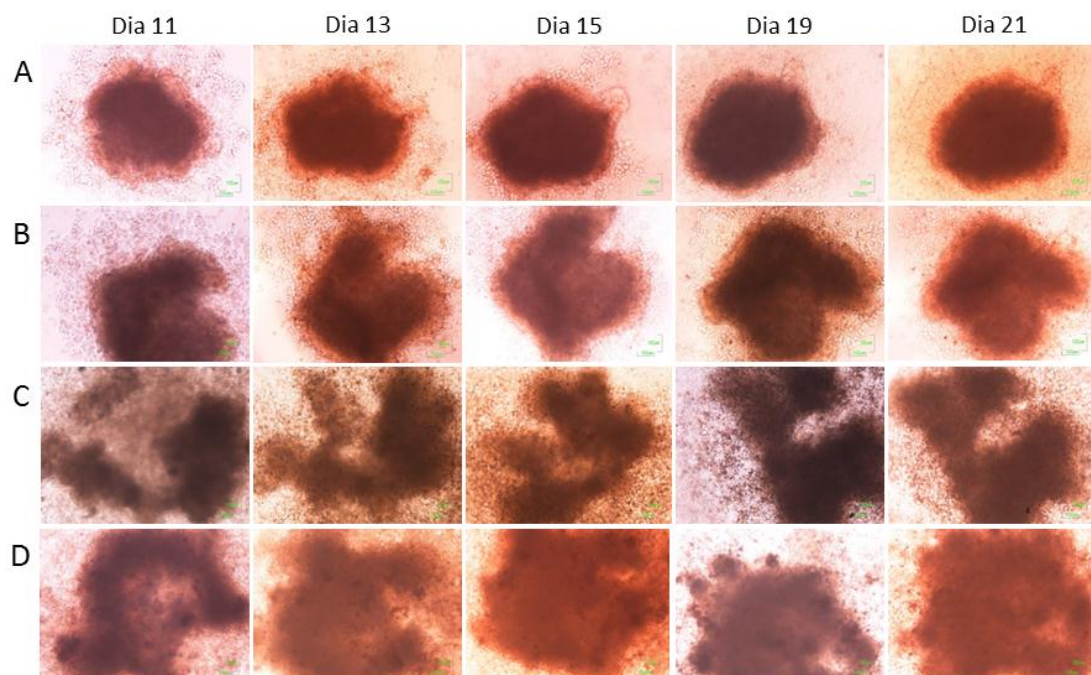


Figura 25: Fotomicrografia dos esferóides formados com células de melanoma humano da linhagem SKMEL-37 em placas de 96 poços com a superfície revestida com agarose. Os esferóides foram formados com quatro diferentes densidades: (A) 2×10^3 células/poço; (B) 4×10^3 células/poço; (C) 2×10^4 células/poço; (D) 4×10^4 células/poço. Estes esferóides ficaram incubados em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ por um período de 21 dias. Durante o período de incubação, a formação e crescimento dos esferóides foram acompanhados através de um microscópio de luz invertida.

Observamos que nas condições usadas neste método, houve a formação e crescimento dos esferóides. Embora fossem obtidos esferóides únicos em todos os poços da placa, foi possível observar que algumas células aderiram ao gel de agarose.

Os esferóides obtidos através deste método apresentaram tamanhos, formas e graus de compactação variados. Os esferóides formados com 2×10^3 e 4×10^3 são mais compactos e apresentaram forma mais esférica (figura 25A-B), enquanto os esferóides formados com 2×10^4 e 4×10^4 células estavam menos compactos e com formatos irregulares (Figura 25C-D). Além disso, observamos que esses esferóides apresentaram maior tamanho quando comparados com os esferóides formados com 2×10^3 e 4×10^3 células. Todos os esferóides que foram formados, aparentemente, apresentaram um aumento no tamanho no dia 21 de cultivo em comparação com o dia 11.

Após 06 dias de incubação, observamos que as células cultivadas nos poços contendo $50 \mu\text{l}$ de agarose, aderiram ao gel de agarose e não houve a formação dos esferóides (figura 26).

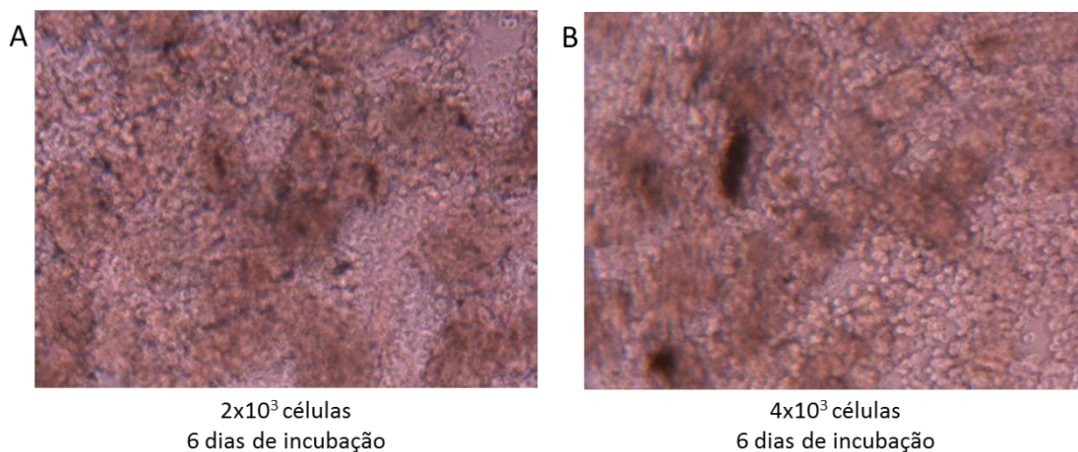


Figura 26: Fotomicrografia das células SKMEL-37 de melanoma cutâneo humano que foram cultivadas em placa de 96 poços contendo $50 \mu\text{l}$ de gel de agarose. Densidades celulares de 2×10^3 (A) e 4×10^3 (B) foram incubadas a 37°C em 5% de CO_2 numa incubadora úmida durante 06 dias. Após esse período observou-se pelo microscópio de luz invertida que não ocorreu a formação do esferóide.

4.1.2 Cultura em gotas suspensas

Nesta técnica, células das linhagens A-375 e SKMEL-37 com densidade $1,8 \times 10^5$ células/poço foram cultivadas na placa Perfecta3D Biomatrix em gotas suspensas para indução da agregação celular espontânea, formando os esferóides. Após 07 dias de incubação, os esferóides foram transferidos para uma placa de 96 poços revestidos com gel de agarose para finalização do desenvolvimento. Somente nesse período foi possível realizar a visualização dos esferóides através do microscópio de luz invertida, pois a visualização é inviável enquanto eles estão nas gotas suspensas (figura 27).

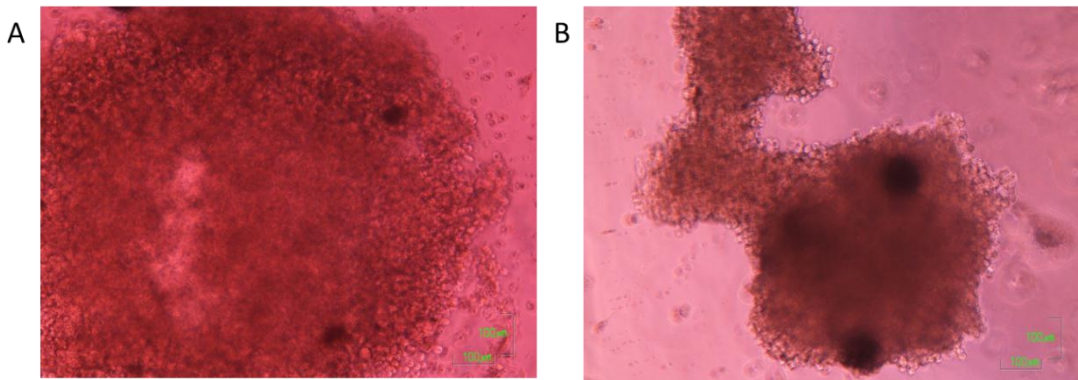


Figura 27: Fotomicrografia da formação dos esferóides na placa Perfecta3D Biomatrix. Suspensão celular de A-375 e SKMEL-37 na densidade de $1,8 \times 10^5$ foram cultivadas em gotas suspensas, promovendo a agregação celular. A placa Perfecta3D Biomatrix contendo as gotas suspensas foi incubada por 07 dias em incubadora úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C . Posteriormente, os esferóides formados a partir das células A-375 (A) e SKMEL-37 (B) foram transferidos para uma placa de 96 poços revestidos com gel de agarose para completa maturação.

Após 07 dias de incubação em gotas suspensas observamos que os esferóides formados com células A-375 estavam descompactados (figura 27A) quando comparado com o grau de compactação dos esferóides formados com células SKMEL-37 (figura 27B). No entanto, os esferóides SKMEL-37 apresentaram tamanhos e formas mais irregulares.

Também se verificou que durante o processo de transferência dos esferóides da placa Perfecta3D Biomatrix para a placa de 96 poços revestidos com agarose alguns esferóides se fragmentaram (figura 28).

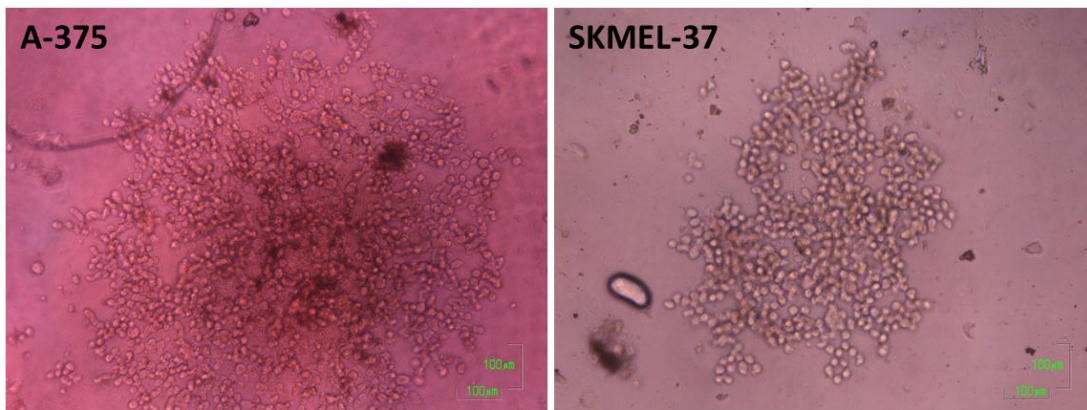


Figura 28: Fotomicrografia representando os esferóides que foram segregados após transferência da placa Perfecta3D Biomatrix para a placa de 96 poços revestidos com agarose.

Somente os esferóides que foram transferidos para a placa de 96 poços revestidos com agarose e que mantiveram sua estrutura foram acompanhados por um período de 72 horas (figura 29). Observamos que os esferóides de A-375 apresentaram maior grau de compactação e delimitação ao término de 10 dias de incubação. Devido a maior compactação das células nestes esferóides, houve aparentemente uma pequena diminuição do seu tamanho entre 08 e 10 dias de incubação (figura 29A). Já os esferóides de SKMEL-37 apresentaram uma maior intensidade de coloração, indicando o aumento da proliferação celular com 10 dias de incubação. Observamos também que após a transferência dos esferóides da placa Perfecta3D Biomatrix para a placa de 96 poços, células da linhagem SKMEL-37 aderiram ao gel de agarose em uma maior proporção em relação às células A-375 (figura 29B).

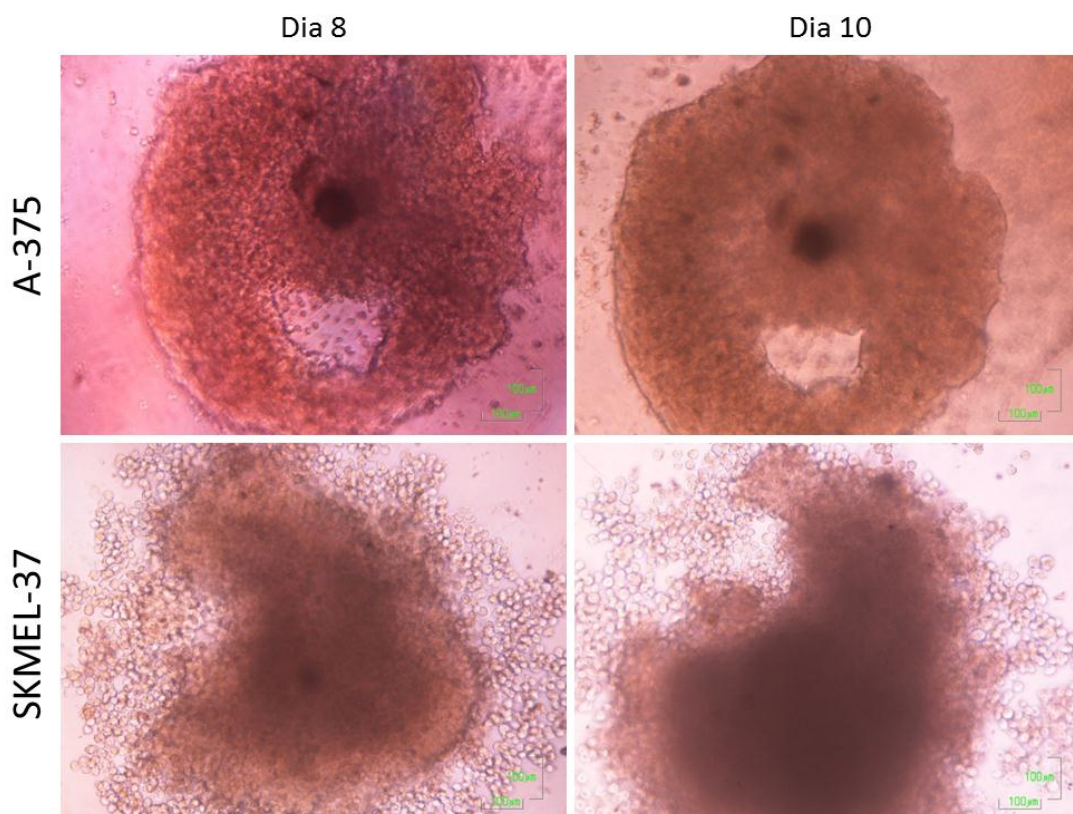


Figura 29: Fotomicrografia representativa dos esferóides após 08 e 10 dias de formação em gotas suspensas na placa Perfecta3D Biomatrix. Após a formação dos esferóides na placa Perfecta3D Biomatrix, estes foram transferidos para a placa de 96 poços revestidos com agarose e ficaram incubados por mais 72 horas, completando 10 dias de incubação.

4.1.3 Cultura em placas de superfície não aderente

A placa Nunclon Sphera de 96 poços possui superfície não aderente, permitindo assim mínima adesão das células à superfície da placa, facilitando a formação de esferóides. Células de melanoma humano das linhagens A-375 e SKMEL-37 foram cultivadas em duas placas em quatro densidades diferentes: 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e 4×10^4 células/poço. Após a transferência da suspensão celular para a placa, essa foi centrifugada para facilitar o agrupamento das células no fundo dos poços (figura 30).

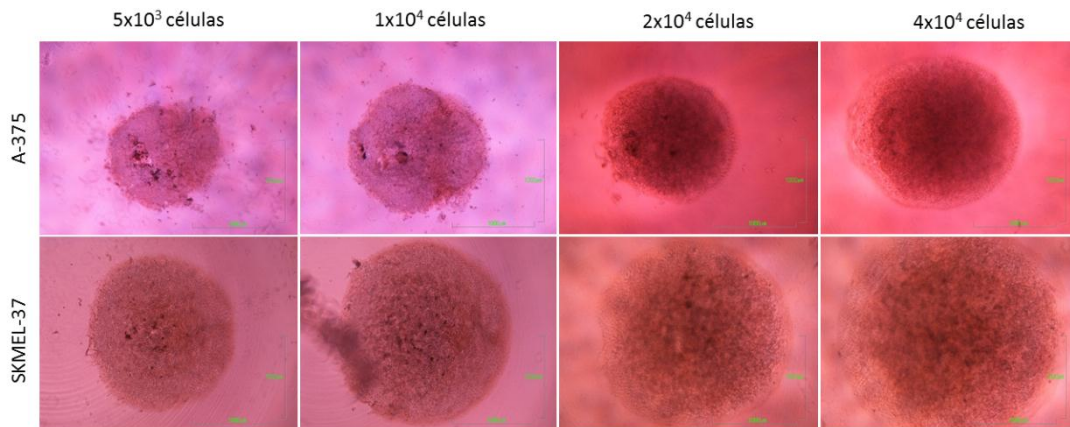


Figura 30: Fotomicrografia das células A-375 e SKMEL-37 após centrifugação na placa Nunclon Sphera. As suspensões celulares de 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e 4×10^4 foram transferidas para os 96 poços da placa Nunclon Sphera. Logo após, a placa foi centrifugada para permitir o agrupamento das células nos poços.

Em uma placa foram cultivadas as densidades celulares de 5×10^3 e 1×10^4 células/poço (placa 01). Essa placa ficou incubada por um período total de 10 dias em incubadora úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C e periodicamente o processo de formação e crescimento dos esferóides foi acompanhado através da visualização destes em um microscópio de luz invertida. Sob essas condições, as células A-375 e SKMEL-37 começaram a se agregar para dar início a formação dos esferóides após 24 horas de incubação, independente da densidade celular. Após 72 horas de incubação observamos o aumento do grau de compactação e delimitação dos esferóides, indicando sua formação. A morfologia dos esferóides apresentou diferença entre as duas linhagens. As células A-375 tendem a formar estruturas mais esféricas, enquanto as células SKMEL-37 apresentam formatos mais irregulares. Devido ao aumento da compactação das células, o tamanho dos esferóides incubados por 72 horas é menor em relação a 24 horas (figura 31).

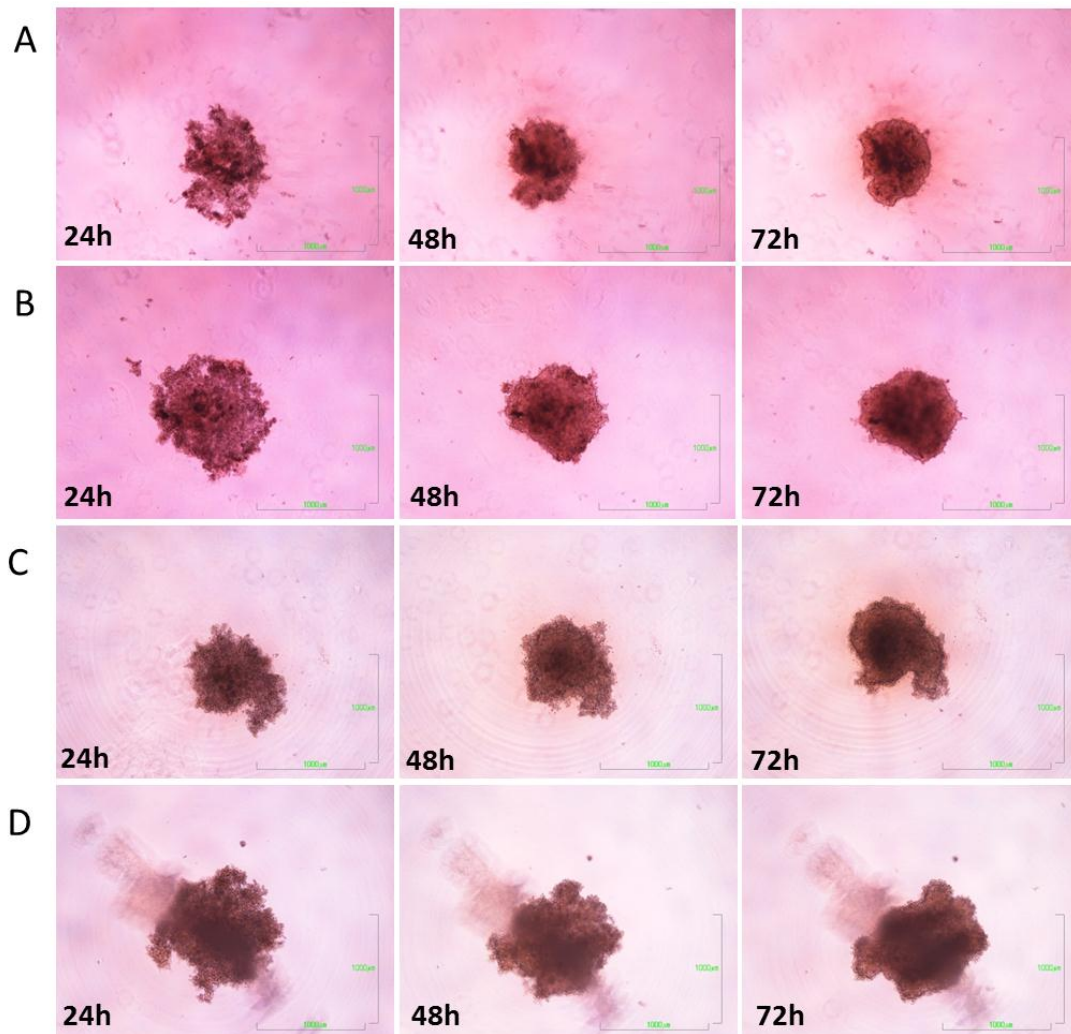


Figura 31: Fotomicrografia do processo de formação dos esferóides na placa Nunclon Sphera. Suspensão celular de 5×10^3 células A-375 e SKMEL-37 (A e C, respectivamente) e 1×10^4 células A-375 e SKMEL-37 (B e D, respectivamente) foram transferidas para os 96 poços da placa Nunclon Sphera e mantidas em incubadora úmida com 5% de CO_2 e 37°C . O processo de formação foi observado através de microscópio de luz invertida e os esferóides foram fotomicrografados com 24h, 48h e 72h de incubação.

A figura 32 representa o processo de crescimento dos esferóides da placa 01 no 4^o, 6^o e 7^o dias após o período de formação. Posteriormente às 72 horas iniciais de incubação para a formação dos esferóides, 100 μl do meio de cultura foi retirado e ao repor esse volume, algumas células dissociaram e se aglomeraram ao redor do esferóide. Porém, isso não prejudicou o desenvolvimento dos esferóide, pois foi possível observar que o tamanho desses aumentou gradualmente conforme o aumento do período de incubação. No 7^o dia de incubação o esferóide formado com 5×10^3 células SKMEL-37 desprende-se do aglomerado de células que havia se

formado abaixo dele durante a reposição do meio de cultura e o esferóide formado com 1×10^4 células SKMEL-37 foi degradado.

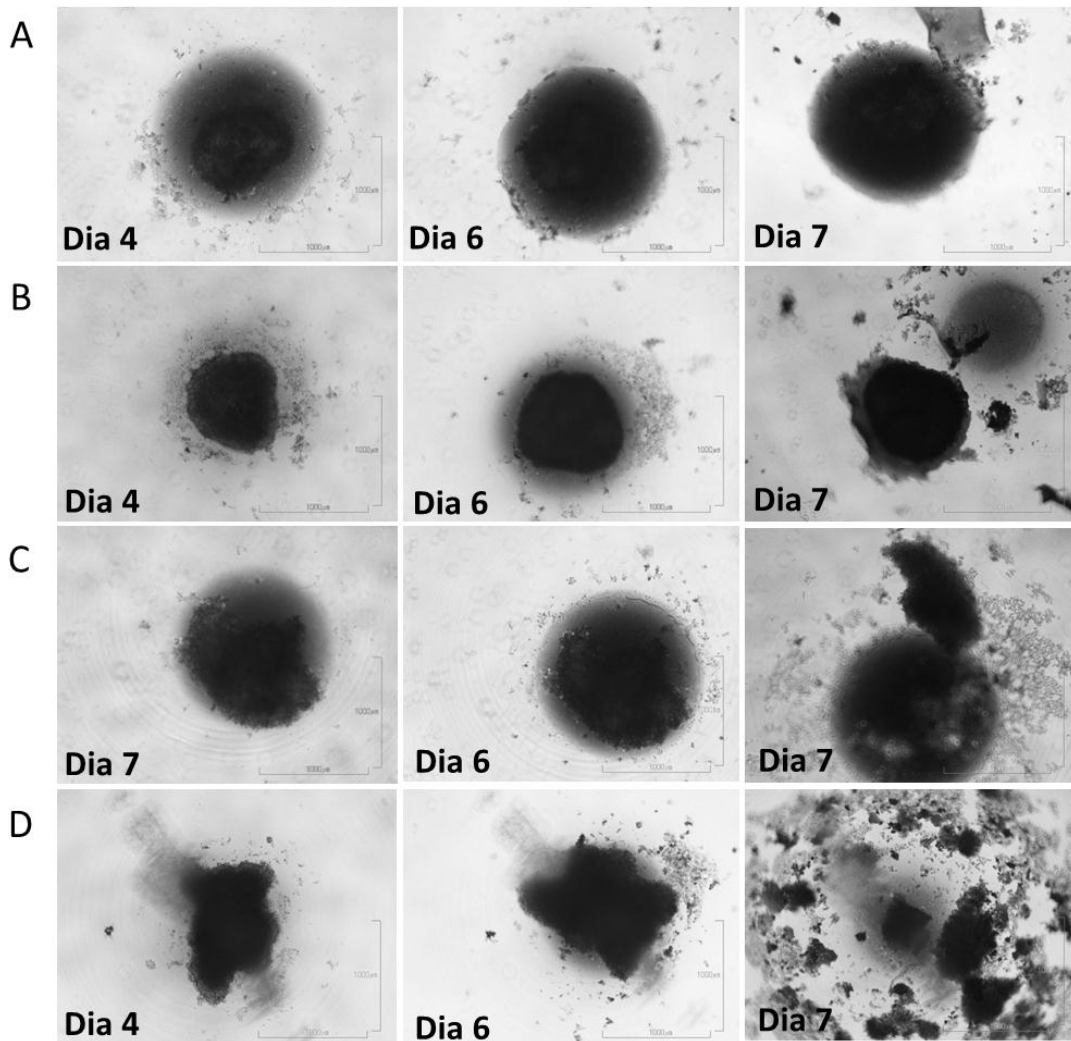


Figura 32: Fotomicrografia representando os esferóides incubados por 04, 06 e 07 dias após o período de 72 horas de sua formação na placa Nunclon Sphera. (A) esferóides formados com 5×10^3 células A-375; (B) esferóides formados com 1×10^4 células A-375; (C) esferóides formados com 5×10^3 células SKMEL-37; (D) esferóides formados com 1×10^4 células SKMEL-37. Estes esferóides formados e mantidos na placa Nunclon Sphera foram mantidos por um período total de 10 dias em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Observamos na placa com células A-375 e SKMEL-37 nas densidades de 2×10^4 e 4×10^4 que os esferóides desenvolveram-se a partir de agregados de células menores que proliferaram ao longo dos dias. Os esferóides formados a partir de uma maior densidade celular apresentaram, conseqüentemente, tamanho maior. Os esferóides formados com células A-375 após 07 dias de incubação exibiram uma forma mais uniforme,

esférica/oval, bordas definidas, boa delimitação, conseqüentemente são considerados esferóides de melhor qualidade, quando comparados com os esferóides formados pelas células SKMEL-37 que apresentaram bordas irregulares e baixa delimitação. Os esferóides de A-375 com 72 horas de incubação já apresentaram maior grau de compactação em relação aos esferóides de SKMEL-37 com 07 dias de incubação. Observamos em todos os esferóides formados que a tonalidade da coloração intensificou ao longo dos dias de incubação, indicando aumento do grau de compactação e proliferação celular (figura 33).

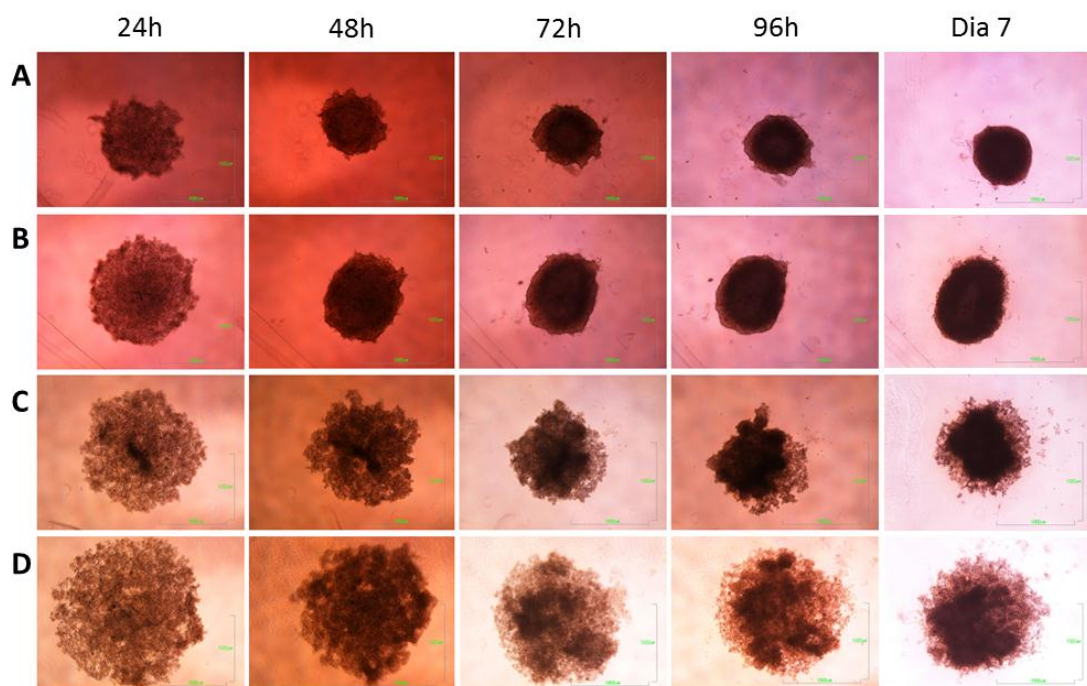


Figura 33: Fotomicrografia do processo de formação dos esferóides na placa Nunclon Sphera durante o período de 07 dias de incubação. (A) esferóides formados com 2×10^4 células A-375; (B) esferóides formados com 4×10^4 células A-375; (C) esferóides formados com 2×10^4 células SKMEL-37; (D) esferóides formados com 4×10^4 células SKMEL-37. Estes esferóides foram incubados em incubadora úmida com 5% de CO_2 a 37°C por um período de 07 dias a fim de promover a formação e crescimento dos esferóide.

4.2 Reações de RT-PCR convencional

Para as reações de RT-PCR convencional, os esferóides formados na placa Nunclon Sphera (placa 01) com densidades de 5×10^3 e 1×10^4 células/poço, foram retirados da placa e armazenados a -20°C após o período de formação (72 horas), 04 e 07 dias de incubação. O RNA dessas

amostras foi extraído para análise da expressão gênica dos transportadores ABC (ABCB1, ABCB5 e ABCB8).

Não foi possível obter concentrações de RNA suficientes para análise da expressão gênica dos esferóides formados com 5×10^3 células A-375 e SKMEL-37, portanto, não utilizamos essas amostras no estudo.

A fim de detectar a presença dos transportadores da família ABC nos esferóides formados com 1×10^4 células A-375 e SKMEL-37, realizamos RT-PCR convencional com os iniciadores específicos para os genes ABCB1, ABCB5 e ABCB8.

Através da visualização dos produtos de PCR pela eletroforese de gel de agarose foi possível observar que os esferóides de células A-375 na densidade de 1×10^4 células/poço expressaram o gene ABCB1 em todos os períodos em que os esferóides ficaram incubados, assim como o gene ABCB8 também foi expresso (figura 34A-C, linhas 1 e 3, respectivamente). Já o gene ABCB5 não foi expresso em nenhum período de incubação dos esferóides (figura 34A-C, linha 2).

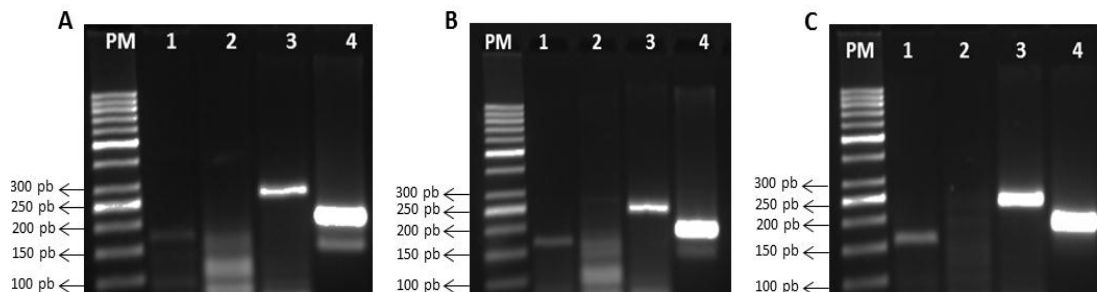


Figura 34: Perfil do produto amplificado das reações de RT-PCR utilizando esferóides da linhagem A-375 formados com 1×10^4 células. Estes esferóides foram cultivados nos poços da placa Nunclon Sphera e retirados para análise após o período de formação (72 horas) (A), 04 (B) e 07 (C) dias de incubação em incubadora úmida com 5% de CO_2 a 37°C . Marcador de peso molecular DNA ladder 50 pb (PM), ABCB1 (1), ABCB5 (2), ABCB8 (3) e GAPDH (4). Eletroforese em gel de agarose a 3,0%.

Durante os 07 dias de incubação após a sua formação, os esferóides formados com 1×10^4 células SKMEL-37/poço não apresentaram nenhum produto de amplificação dos genes ABCB1 e ABCB5 (figura 35A-C, linhas 1 e 2, respectivamente). Observamos que apenas o gene ABCB8 foi expresso em todos os períodos em que estes esferóides ficaram incubados (figura 35A-C, linha 3).

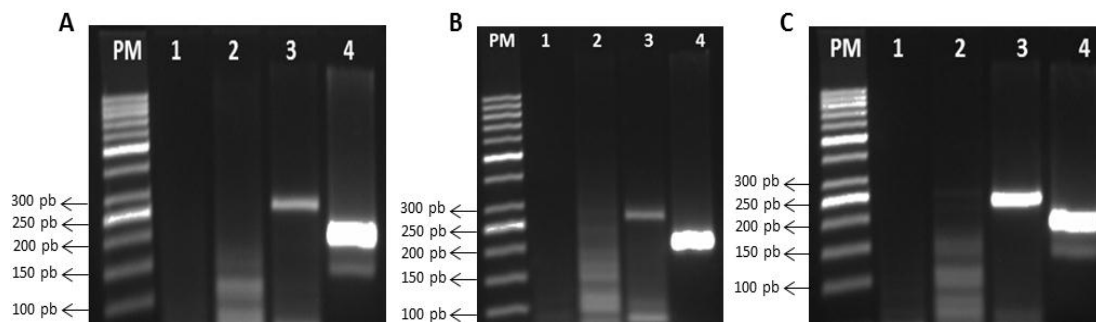


Figura 35: Perfil de expressão dos produtos de RT-PCR utilizando esferóides formados com 1×10^4 células da linhagem SKMEL-37. Após as 72 horas de formação (A), 04 (B) e 07 dias (C) o processo de formação e crescimento destes esferóides foi acompanhado. Marcador de peso molecular DNA ladder 50 pb (PM), ABCB1 (1), ABCB5 (2), ABCB8 (3) e GAPDH (4).

O gene GAPDH foi expresso em todos os períodos de incubação dos esferóides formados com células A-375 e SKMEL-37. Este gene foi utilizado como gene normalizador.

4.3 Padronização da RT-PCR em tempo real

4.3.1 Padronização da concentração dos primers

Para testar a menor concentração dos pares de iniciadores capazes de amplificar com especificidade as amostras, foram utilizados iniciadores específicos dos genes ABCB1, ABCB5, ABCB8 e GAPDH, sendo este último controle endógeno, considerado gene *housekeeping*. Para realizar as reações de qRT-PCR foi utilizado cDNA sintetizado com 1 ng de RNA de células SKMEL-37 cultivadas em monocamada e cinco diferentes concentrações de cada sequência de primer: 50, 100, 200, 300 e 400 nM.

Após amplificação, foi realizada uma análise do perfil da curva de dissociação e foi possível observar que para todos os genes dos transportadores ABC utilizados neste estudo a concentração na faixa de 100 nM de primer apresentou apenas um pico na reação indicando uma amplificação específica de um único fragmento e ausência de dímeros de primer (figura 36). Em relação ao gene endógeno GAPDH, a concentração na faixa de 100 nM também foi a menor concentração capaz de amplificar com especificidade as amostras (figura 37).

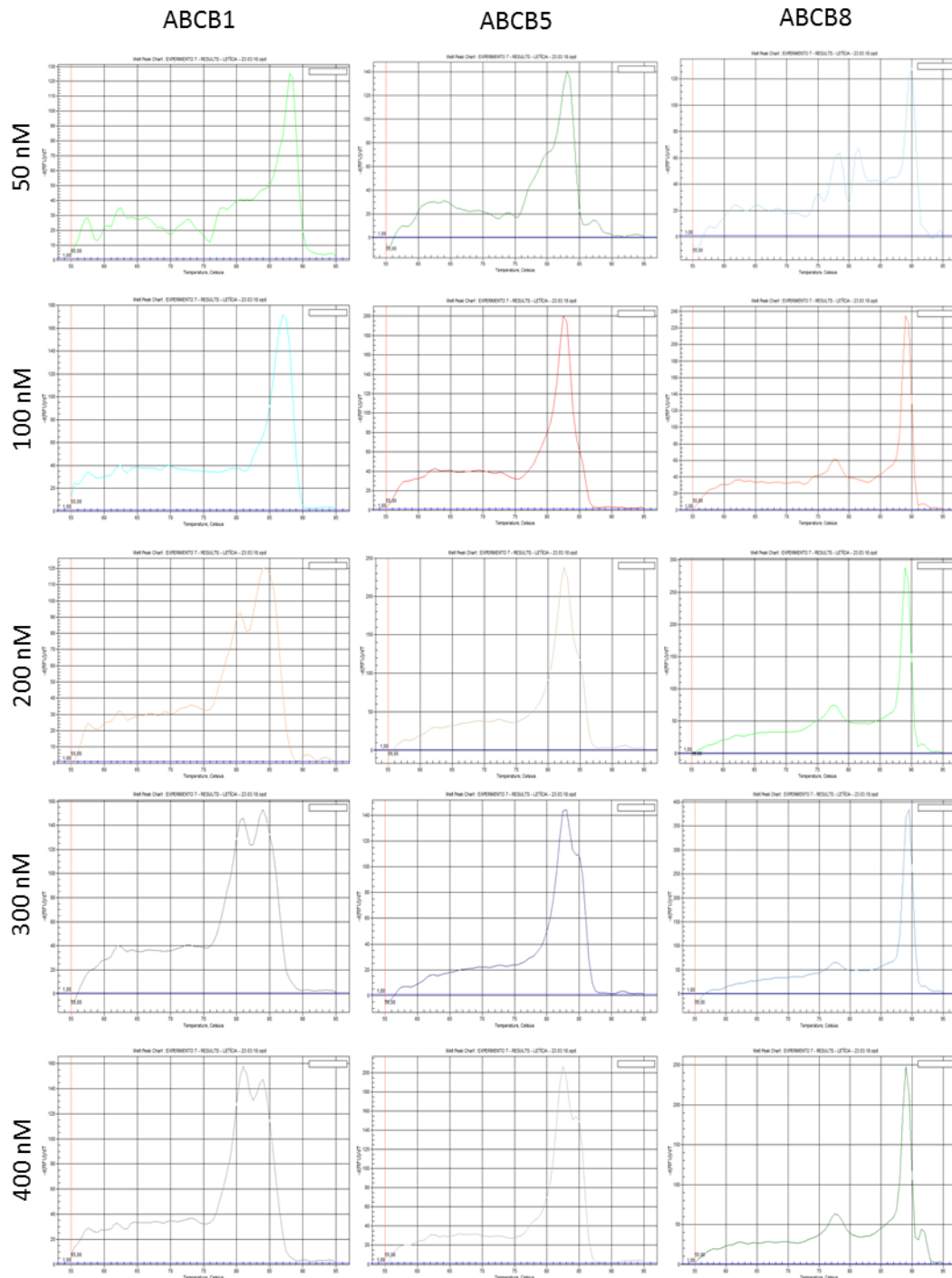


Figura 36: Perfil das curvas de dissociação dos genes de interesse. Os iniciadores para qRT-PCR dos transportadores ABC utilizados neste estudo (ABCB1, ABCB5 e ABCB8) foram padronizados em relação a concentração. Para isso, foram utilizadas 5 diferentes concentrações (50, 100, 200, 300 e 400 nM) e a análise foi feita através do pico da curva de dissociação.

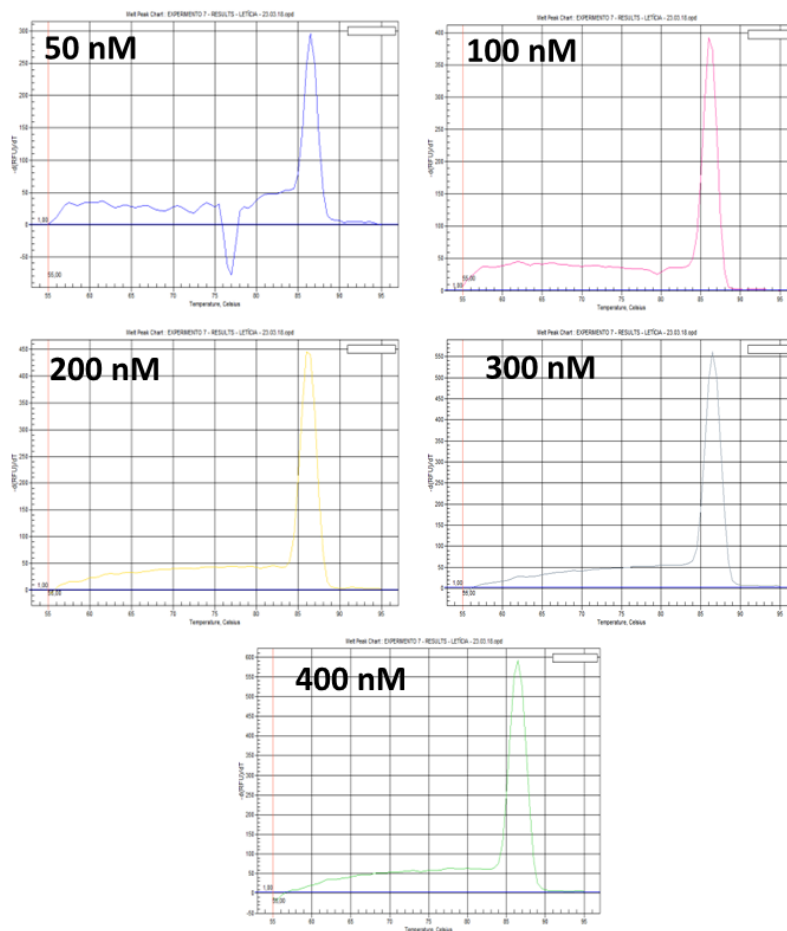


Figura 37: Perfil da curva de dissociação do gene endógeno (GAPDH). Os iniciadores para qRT-PCR do gene endógeno utilizado neste estudo foram padronizados em relação a concentração. Para isso, foram utilizadas 5 diferentes concentrações (50, 100, 200, 300 e 400 nM) e a análise foi feita através do pico da curva de dissociação.

4.3.2 Curva de eficiência de amplificação do qRT-PCR

Após a determinação da concentração dos primers, utilizou-se esta concentração de 100 nM para realizar uma curva padrão, a fim de verificar a eficiência de amplificação da reação. Para todos os ensaios, foram analisadas diluições seriadas de cDNA (10; 5; 2,5; 1,2; 0,6 e 0,3 ng) das amostras SKMEL-37 cultivadas em monocamada. Os dados do log da concentração de cDNA *versus* valor de Ct para cada ensaio de amplificação originou uma curva-padrão, cujo coeficiente angular da reta (slope) foi utilizado para cálculo de eficiência do respectivo ensaio. A tabela 6 mostra os valores de slope e eficiência da reação obtida para os diferentes genes

estudados. As reações padronizadas apresentaram uma eficiência semelhante, o que permitiu a utilização do método de $\Delta\Delta CT$ comparativo.

Tabela 6: Valores de slope e eficiência para cada primer obtidos através da curva de eficiência de amplificação do qRT-PCR em células SKMEL-37.

	Slope	Eficiência
ABCB1	-2,6	139%
ABCB5	-2,9	118%
ABCB8	-2,9	118%
GAPDH	-3,0	113%

4.4 Reações de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

A emissão de fluorescência foi detectada para cada ciclo de PCR e os valores do ciclo limiar (C_T) foram determinados. A média dos valores de C_T das reações de PCR em duplicata foi normalizada pelos valores médios de C_T para o gene *housekeeping* (GAPDH). Como controle da reação foi utilizada a amostra de cDNA dos esferóides referentes ao tempo 0, ou seja, esferóides retirados para análise logo após o período de 72 horas de formação. A quantificação da expressão gênica foi realizada através do método de quantificação relativa (método $\Delta\Delta CT$). Os resultados obtidos para as linhagens celulares A-375 e SKMEL-37 foram analisados por *One Way* ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

As reações de qRT-PCR possibilitaram a análise da expressão dos genes ABCB1, ABCB5 e ABCB8 nas duas linhagens celulares de melanoma cutâneo estudadas. O gene ABCB5 não foi expresso nas células A-375, assim como também não foi expresso nas células SKMEL-37. Resultado semelhante ao encontrado no RT-PCR convencional.

Os esferóides formados pelas células A-375 apresentaram um aumento do nível de expressão do gene ABCB1 com 07 dias de incubação após sua formação quando comparado com o nível de expressão dos esferóides do tempo 0 (controle) e 04 dias incubação ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os esferóides do tempo 0 e tempo 4 de incubação ($p = NS$) (figura 39).

Houve um aumento da expressão do gene ABCB8 nos esferóides formados pelas células A-375 com 07 dias de incubação após seu período de formação em relação aos esferóides do controle (tempo 0) e do tempo 04 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os resultados da expressão do gene ABCB8 nos esferóides incubados por 04 dias após sua formação não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos esferóides do tempo 0 ($p = \text{NS}$) (figura 38).

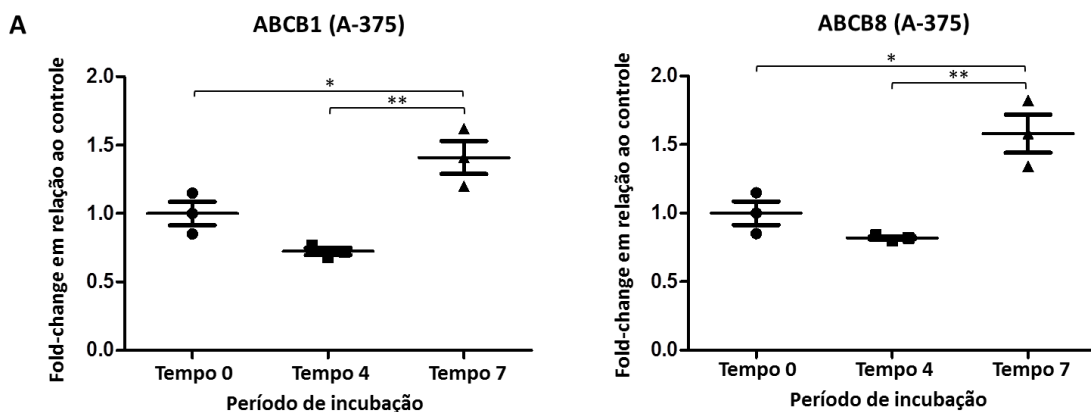


Figura 38: Perfil de expressão dos genes ABCB1 e ABCB8 nos esferóides da linhagem de melanoma A-375. A média dos valores de CT das duplicatas de cada experimento independente foi normalizada pela expressão do gene GAPDH e em relação à média dos valores de CT dos esferóides no tempo 0 (controle). O gráfico demonstra os valores de Fold-change dos esferóides no tempo 4 e 7 em relação ao controle. A análise de variância utilizada foi *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste de Tukey. Foi considerado significativo $p < 0.05$.

Nos esferóides formados pelas células SKMEL-37, o gene ABCB1 foi expresso em todos os tempos de incubação, sendo que no período de 04 após a sua formação o nível de expressão não apresentou diferença significativa em relação ao controle (tempo 0) ($p = \text{NS}$). Com 07 dias de incubação após sua formação, os esferóides dessa linhagem apresentaram um aumento do nível de expressão do gene ABCB1 em relação ao tempo 0 e 4 de incubação ($p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente) (figura 39).

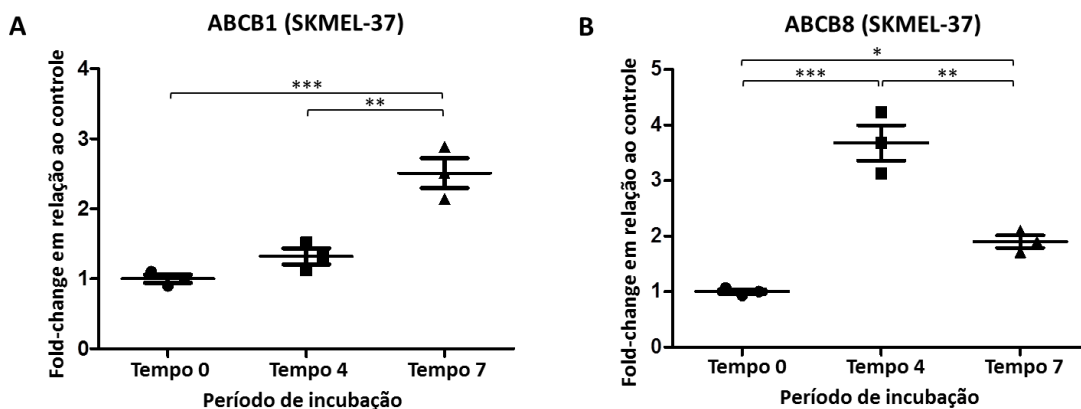


Figura 39: Perfil de expressão dos genes ABCB1 e ABCB8 nos esferóides da linhagem de melanoma SKMEL-37. A média dos valores de CT das duplicatas de cada experimento independente foi normalizada pela expressão do gene GAPDH e em relação à média dos valores de CT dos esferóides no tempo 0 (controle). O gráfico demonstra os valores de Fold-change dos esferóides o tempo 4 e 7 em relação ao controle. A análise de variância utilizada foi *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste de Tukey. Foi considerado significativo $p < 0.05$.

Esferóides das células SKMEL-37 apresentaram um aumento do nível expressão do gene ABCB8 no período de 07 dias de incubação após sua formação quando comparado com a expressão dos esferóides no tempo 0 ($p < 0,05$). Após 04 dias de incubação os esferóides dessa linhagem aumentaram a expressão do gene ABCB8 em relação ao controle ($p < 0,01$). No entanto, entre os períodos de incubação de 04 e 07 dias após a formação dos esferóides, ocorre uma diminuição do nível de expressão deste gene ($p < 0,01$) (figura 39).

A especificidade dos produtos de qRT-PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Todos os produtos de PCR tinham o tamanho correto e ligação específica, confirmando a especificidade dos ensaios de qRT-PCR.

5. DISCUSSÃO

Melanoma cutâneo é uma das malignidades mais agressivas, representando um problema de saúde pública em muitos países porque sua incidência aumentou de forma constante nos últimos 30 anos e as estatísticas estimam a duplicação da incidência a cada 10-20 anos (SANDRU et al., 2014). Sua evolução imprevisível, mortalidade preocupante e um tratamento com resultados modestos ou até mesmo ausentes em estágios avançados, caracterizam um ruim prognóstico com apenas 5% a 10% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivendo por 05 anos (BANDARCHI et al., 2013).

A resistência tumoral aos quimioterápicos tem sido um grande obstáculo ao sucesso do tratamento do melanoma, sendo alvo de pesquisa e, nesse contexto, torna-se importante a busca de modelos que possibilitam compreender o comportamento da célula e do microambiente tumoral.

Com o objetivo de padronizar um método simples de executar, eficiente e de alto rendimento que melhor representasse o microambiente tumoral *in vitro*, foi proposto neste estudo o cultivo 3D de células de melanoma humano, através da formação dos esferóides. As técnicas mais utilizadas para a formação dos esferóides é baseado na agregação celular em placas com poços revestidos com gel de agarose, gotas suspensas ou em placas com superfície de baixa adesão (TRINCH et al., 2016).

O primeiro método utilizado neste estudo foi a formação dos esferóides através da cultura em placas com a superfície revestida com gel de agarose. Segundo Ravi e colaboradores (2015), o gel de agarose é de simples e fácil uso para formar esferóides em culturas 3D, porém cada linhagem celular exige diferentes condições, como concentração do gel de agarose, densidade celular e período de incubação. Nossos resultados indicaram que células da linhagem SKMEL-37 foram capazes de se agregarem e formarem esferóides de tamanho, forma e grau de compactação variados independente da densidade celular. Contudo, as menores densidades celulares (2×10^3 e 4×10^3 células/poço) desenvolveram

melhores esferóides apresentando maior compactação celular e forma mais esférica ao longo dos 21 dias de incubação.

Apesar de essa técnica permitir a formação de um único esferóide por poço, nossos resultados demonstraram que houve a formação de colônias de células ao redor do esferóide. Outra desvantagem dessa técnica observada neste estudo é o desprendimento do revestimento do gel de agarose da superfície do poço durante a remoção e reposição do meio de cultura.

A fim de verificar o melhor meio de induzir a agregação celular através da mínima ligação das células às superfícies da placa, além de apenas revestir os poços com gel de agarose, depositamos 50 μ l deste gel em alguns poços. Nossos resultados indicaram que neste caso as células SKMEL-37 interagiram com o gel de agarose e não houve a formação de esferóides.

Apesar da grande utilização de hidrogéis como matrizes ou estruturas para formação de esferóides, estes podem interagir com as células, alterando o microambiente tumoral (HOARAU-VECHOT et al., 2018). O método de formação dos esferóides através de gotas suspensas é baseado na tendência natural das células aderirem umas às outras, eliminando as preocupações com relação aos efeitos que os hidrogéis podem causar nos esferóides (RAGHAVAN et al., 2015).

Para a formação de esferóides das linhagens celulares A-375 e SKMEL-37 através do método de gotas suspensas, utilizamos neste estudo a placa Perfecta3D Biomatrix. Nesta técnica, as células aumentam a tensão superficial que mantém a gota pendente, por isso não foi possível acompanhar todo o processo de formação e crescimento dos esferóides através do microscópio de luz invertida. Essa placa é projetada de modo que seja possível remover um pequeno volume de meio de cultura da gota e fazer a substituição por um volume maior para compensar a evaporação. No entanto, encontramos limitação em remover e adicionar o meio de cultura, devido à dificuldade em aspirar o meio gasto sem perturbar os esferóides. Essa dificuldade também foi encontrada ao transferir os esferóides da placa Perfecta3D Biomatrix após 07 dias de incubação para a placa de 96 com

poços revestidos com gel de agarose, causando a fragmentação dos esferóides, independente da linhagem celular.

Nossos resultados indicaram que os esferóides formados pela linhagem SKMEL-37 que mantiveram sua estrutura após a transferência foram capazes de se agregarem e formarem esferóides com maior grau de compactação quando comparados com os esferóides formados pela linhagem A-375. Após o 3º dia de incubação na placa de 96 poços para dar continuidade ao crescimento dos esferóides, observamos que estes apresentaram dimensões, formas e graus de compactação variados, além do mais as células SKMEL-37 interagiram com o gel de agarose em uma maior proporção quando comparadas com as células A-375.

Neste estudo, um modelo de cultura 3D com placas de 96 poços de baixa adesão (Nunclon Sphera) foi utilizado. Nossos resultados demonstraram que usando a placa Nunclon Sphera fomos bem sucedidos. Os poços de fundo U com superfície que fornece mínima ligação às células foram ideais para a formação de um único esferóide em cada poço, oferecendo consistência e reprodutibilidade ao sistema de modelo de tumor 3D *in vitro*.

A formação dos esferóides na placa Nunclon Sphera foi superior em relação aos outros dois métodos utilizados neste estudo, promovendo agregação celular após 24 horas de incubação e formação dos esferóides com 72 horas de incubação, independente da densidade celular (5×10^3 ou 1×10^4 células/poço).

Após 07 dias de incubação, os esferóides formados na placa Nunclon Sphera com maiores densidades celulares iniciais (2×10^4 e 4×10^4 células/poço) exibiram um aumento na compactação. Os esferóides da linhagem A-375 adquiriram uma forma mais esférica e com boa delimitação de borda, enquanto os esferóides formados pelas células SKMEL-37 apresentaram bordas irregulares, formas mais variadas e baixa delimitação de borda. Em todos os casos houve a intensificação da coloração. Esses resultados indicam que cada linhagem celular se comporta de maneira diferente durante a formação e crescimento dos esferóides.

Portanto, após os três testes de padronização para formação dos esferóides utilizando as linhagens de melanoma cutâneo SKMEL-37 e A-

375, observamos que o método ideal é a cultura em placas de superfície não aderente, utilizando menores densidades celulares (2×10^3 e 1×10^4).

A placa Nunclon Sphera permite melhor controle do tamanho dos esferóides a partir da quantidade de células semeadas, portanto as menores densidades celulares formaram esferóides com menores dimensões, mais compactos e com maior delimitação de borda. Além disso, o design dessa placa permitiu um alto rendimento e eficiência na formação e crescimento dos esferóides, tornando este método reproduzível. Neste estudo, a placa Nunclon Sphera permitiu a análise dos esferóides sem a necessidade de transferir as células para uma placa diferente, sendo uma vantagem em relação ao método de gotas suspensas.

Para o melanoma maligno, a quimioterapia bem sucedida é geralmente limitada pela resistência intrínseca à droga. Essa resistência geralmente é em relação a um amplo espectro de drogas citotóxicas estruturalmente não relacionadas, caracterizando o quadro de resistência a múltiplas drogas (MDR). Os mecanismos que conferem MDR às células de melanoma cutâneo ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, sabe-se que vários deles estão associados com a alta expressão dos transportadores ABC (SUN et al., 2012; GERETTO et al., 2017).

A correlação entre a expressão dos transportadores ABC em tumores malignos e a MDR tem sido amplamente investigada. Estudos comparativos do perfil de expressão gênica revelaram que genes associados à proliferação, diferenciação, resistência à terapia e migração são diferencialmente expressos em células mantidas como esferóides em comparação com culturas 2D. Baseado em relatos da presença e atividade de resistência á drogas em melanoma cutâneo humano, analisamos nesse estudo a expressão dos transportadores ABCB1 (PAN et al., 2015), ABCB5 (SCHATTON et al., 2008) e ABCB8 (BASU et al., 2017) em esferóides formados na placa Nunclon Sphera, com densidade inicial de 1×10^4 células de melanoma cutâneo das linhagens A-375 e SKMEL-37, incubados por um período de 10 dias.

O gene ABCB1 é expresso em vários tecidos e foi extensivamente relatado em conferir resistência a uma quantidade de drogas antitumorais

em diferentes formas de tumores malignos humanos, incluindo melanoma cutâneo *in vitro* (BASU et al., 2017).

No presente estudo, tanto os esferóides formados pelas células SKMEL-37 quanto pela A-375 apresentaram um aumento do nível de expressão gênica do transportador ABCB1 no 7º dia de incubação após seu período de formação em relação ao controle. Além disso, nas duas linhagens celulares, a expressão do gene ABCB1 nos esferóides do tempo 04 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à expressão nos esferóides do tempo 0, indicando que o aumento da expressão do gene ABCB1 nos esferóides ocorre após o período de 04 dias de incubação.

Existem muitas controvérsias em relação ao papel do gene ABCB1 na quimiorresistência do melanoma cutâneo. Assim como observamos a expressão do gene ABCB1 nas linhagens A-375 e SKMEL-37, Heirmerl e colaboradores (2007) observaram que a maioria das linhagens de melanoma estudadas também expressaram o gene ABCB1. No entanto, outros estudos identificaram que há pouca ou nenhuma expressão de ABCB1 em células de melanoma humano (ELLIOT e AL-HAJJ, 2009).

A expressão gênica do transportador ABCB5 é alvo de pesquisas e está associada à progressão clínica do tumor, à resistência terapêutica e à recorrência em pacientes com câncer, inclusive no melanoma cutâneo. Contudo, seu nível de expressão está correlacionado com o grau de evolução do melanoma (SCHATTON et al., 2008; ELLIOT; AL-HAJJ, 2009; KUPAS et al., 2011; CHARTRAIN et al., 2012; SETIA et al., 2012). Nossos resultados indicaram que os esferóides formados pelas células A-375 e SKMEL-37 não expressaram este gene, tanto nas reações de RT-PCR convencional quanto nas reações de RT-PCR em tempo real.

Os dois primeiros estudos moleculares envolvendo a expressão gênica do transportador ABCB5 no melanoma foram realizados por Frank e colaboradores (FRANK et al., 2003; FRANK et al., 2005). Os primeiros resultados encontrados por eles identificaram a pele como o principal tipo de tecido para a expressão do gene ABCB5 (FRANK et al., 2003). Posteriormente, observaram que o gene ABCB5 foi expresso em todas as

linhagens de melanoma estudadas, incluindo células provenientes de tumores primários e metástases (FRANK et al., 2005).

As informações em relação ao padrão de expressão do gene ABCB5 e sua função ainda são bastante limitadas e apresentam bastantes controvérsias entre os pesquisadores. Enquanto alguns estudos identificaram alto nível de expressão gênica do transportador ABCB5 em melanoma cutâneo humano (HUAN et al., 2004; FRANK et al., 2005; VÁSQUEZ-MOCTEZUMA et al., 2010), outros identificaram baixa ou nenhuma expressão deste mesmo transportador em amostras de melanoma primário e metastático.

Heimerl e colaboradores (2007) através de um estudo envolvendo a expressão gênica de vários transportadores ABC conhecidos em linhagens celulares derivadas de melanócitos normais, melanoma primário e melanoma metastático, forneceram uma visão abrangente em relação aos níveis de expressão do transportador ABCB5. Este gene foi encontrado altamente expresso em melanócitos normais, porém em células derivadas de melanoma primário e metastático sua expressão diminuiu pelo menos duas vezes em comparação com a expressão em melanócitos normais. Elliot e Al-Hajj (2009) fizeram análise da expressão gênica do transportador ABCB5 por meio da técnica de RT-qPCR e encontraram níveis de expressão relativamente baixos do gene ABCB5 em comparação com os níveis de expressão de outros transportadores da família ABC.

As células das linhagens A-375 e SKMEL-37 são provenientes de melanomas amelanóticos. Neste tipo de melanoma os melanócitos perdem sua função de produzir melanina. De acordo com Heimerl e colaboradores (2007), a diminuição da expressão do gene ABCB5 pode estar correlacionada com uma perda de funções específicas dos melanócitos durante a melanogênese. Possivelmente este é o motivo esse pelo qual as linhagens utilizadas no presente estudo não expressaram o gene ABCB5.

Em relação ao gene ABCB8, este foi expresso em todos os períodos de incubação dos esferóides. Nas duas linhagens estudadas houve um aumento dos níveis de expressão gênica do transportador ABCB8 nos esferóides após 07 dias de incubação. Resultados semelhantes foram encontrados por Schatton e colaboradores (2008), onde observaram em um

estudo envolvendo a análise de vários transportadores ABC em diferentes linhagens de melanoma cutâneo que o gene ABCB8 foi um dos transportadores ABC mais abundantemente expresso nessas linhagens. Elliot e Al-Hajj (2009) também identificaram a expressão do gene ABCB8 em células de melanoma, onde este transportador demonstrou papel específico na mediação de resistência a drogas em células de melanoma cutâneo, principalmente à doxorrubicina. No entanto, eles observaram que o gene ABCB8 além de ser altamente expresso em células de melanoma cutâneo humano, ele também é expresso em melanócitos normais, sugerindo que sua função fisiológica pode ser mais específica do tecido cutâneo do que específica nos casos de melanoma (ELLIOT; AL-HAJJ, 2009).

Estudo realizado por Lee e colaboradores (2013) identificou que o perfil de expressão de genes associados à resistência a drogas são diferencialmente expressos em células mantidas como esferóides, devido a sua complexa estrutura de recapitular os gradientes de concentração de drogas, nutrientes, gases e resíduos que caracterizam os tumores *in vivo*, e todos esses fatores importantes influenciam a resposta à terapia. Assim, o modelo de cultura 3D utilizando placa com superfície não aderente, permitiu analisar as variações temporais nos níveis de expressão dos transportadores ABCB1 e ABCB8. Assim, futuros estudos que visem compreender o papel desses transportadores na mediação de drogas específicas poderiam ser explorados de forma mais realística usando esferóides.

6. CONCLUSÕES

O modelo de cultura celular tridimensional em microplacas com superfície não aderente foi a técnica mais eficaz devido a simples execução e alto rendimento na formação dos esferóides a partir das linhagens de melanoma cutâneo humano A-375 e SKMEL-37.

Por meio da técnica de RT-PCR foi obtido o perfil de expressão dos transportadores ABCB1, ABCB5 e ABCB8 nos esferóides formados pelas células A-375 e SKMEL-37.

Observamos por meio da técnica de RT-PCR em tempo real que há um aumento do nível de expressão dos genes ABCB1 e ABCB8 com o aumento do período de incubação dos esferóides.

A ausência da expressão do gene ABCB5 tanto na RT-PCR convencional quanto na RT-PCR em tempo real, pode estar relacionado com o fato das linhagens A-375 e SKMEL-37 serem provenientes de melanomas amelanóticos.

A análise do perfil de expressão dos genes ABCB1 e ABCB8 em modelo de cultura tridimensional por meio da formação de esferóides fornece uma base mais realística para posteriores estudos visando compreender o papel destes transportadores na mediação de drogas específicas na MDR.

REFERÊNCIAS

ACHILLI, T. M. et al. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 12, n. 10, p. 1347-1360, 2012.

AFTAB, M. N.; DINGER, M. E.; PERERA, R. J. The role of microRNAs and long non-coding RNAs in the pathology, diagnosis, and management of melanoma. **Arch. Bioch. Bioph.**, p. 60-70, 2014.

ALVAREZ-PÉREZ, J.; BALLESTEROS, P.; CERDÁN, S. Microscopic images of intraspheroidal pH by ¹H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. **Magna**, v. 18, p. 293-301, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Facts & Figures. American Cancer Society, 2016. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2016/special-section-cancer-in-asian-americans-native-hawaiians-and-pacific-islanders-cancer-facts-and-figures-2016.pdf>. Acesso em 13 jan. 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Melanoma Skin Cancer. Atlanta: American Cancer Society, 2016. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer.html>. Acesso em 13 jan. 2018.

AVILA, M.; CRUZ, A. O.; RIERA, R. Evidências de revisões sistemáticas Cochrane sobre prevenção e tratamento de melanoma. **Diagn. Trat.**, v. 21, n. 2, p. 84-88, 2016.

BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 36, p. 6199-6206, 2009.

BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatol. Res. Pract.**, v. 2010, 2010.

BANDARCHI, B. et al. Molecular Biology of normal melanocytes and melanoma cells. **J. Clin. Pathol.**, v. 66, n. 8, p. 644-648, 2013.

BARCAUI, C.; MOURA, L. H. Melanoma. In: Boletim informativo do GBM, 13., 2010, São Paulo. **Boletim informativo**. São Paulo: GBM, 2010. p. 1-3.

BASTIAN, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 9, p. 239-271, 2014.

- BASU, R. et al. Growth hormone receptor knockdown sensitizes human melanoma cells to chemotherapy by attenuating expression of ABC drug efflux pumps. **Horm Cancer**, v. 8, n. 3, p. 143-156, 2017.
- BEAUMONT, K. A.; MOHANA-KUMARAN, N.; HAASS, N. K. Modeling melanoma in vitro and in vivo. **Health.**, v. 2, p. 27-46, 2014.
- BEGICEVIC, R. R.; FALASCA, M. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, p. 2362-2385, 2017.
- BENDER, C.; HASSEL, J. C.; ENK, A. Immunotherapy of melanoma. **Oncol Res and Treat.**, v. 39, n. 6, p. 369-376, 2016.
- BRECHTBUHL, E. R. Tratamento do melanoma: doença localizada. **Onco&**, p. 18-24, 2014.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discov Today.**, v. 18, n. 6, p. 240-249, 2012.
- BRIERLEY, J. D.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. TNM classification of malignant tumours. **Hoboken**, 2017.
- BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigm. Cell Mel.**, v. 24, n. 1, p. 35-50, 2011.
- BURDETT, E. et al. Engineering tumors: a tissue engineering perspective in cancer biology. **Tissue Eng. Part. B. Rev.**, v. 16, n. 3, p. 351-359, 2010.
- CALIARI, S.R.; BURDICK, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. **Nat. Methods**, v. 13, p. 405-414, 2016.
- CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. **Drug. Des. Dev. Ther.**, v. 8, p. 1911-1921, 2014.
- CHARTRAIN, M. et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. **Plos One**, v. 7, p. 36762, 2012.
- CHEN, K. G. et al. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. **Pig. Cell. Mel. Res.**, v. 22, n. 9, p. 740-749, 2009.
- CHEN, K. G.; GOTTASMAN, M. M. How melanoma cells evade chemotherapy: Role of transporter-dependent and independent resistance mechanisms. In: HEARING, V. J.; LEONG, S. P. L. **From melanocytes to melanoma: the progression to malignancy**. Totowa: Humana Press, 2006. p. 591-603.

CHEN, Z. et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. **Cancer Let.**, v. 370, p. 153-164, 2016.

CLÍNICA PRIETO LUNA – Cirurgia Plástica e Bem-estar. Site da internet. 2010. Disponível em: <<http://www.clinicaprietoluna.com.br/cirurgias/câncer-de-pele>>. Acesso em: 14 de janeiro de 2018.

DAMSKY, W. E.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncog.**, v. 33, n. 19, p. 2413-2422, 2014.

DEAN, M.; ANNILO, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 6, p. 123-142, 2005.

DERMIS – Dermatology Information System. Site da internet. 2018. Disponível em: <<http://www.dermis.net/dermisroot/pt/18101/image.htm>>. Acesso em: 06 de agosto de 2018.

DE SOUZA E MELO, F. et al. Cancer heterogeneity- a multifacete view. **Embo Rep.**, v. 14, p. 686-695, 2013.

ELLIOT, A.; ADAMNS, J.; AL-HAJJ, M. The ABCs of cancer stem cell drug resistance. **Drugs**, v. 13, n. 9, p. 632-635, 2009.

ELLIOT, A. M.; AL-HAJJ, M.A. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. **Mol Cancer Res.**, v. 7, p. 79-87, 2009.

ELLIOT, N. T.; YUAN, F. A review of three-dimensional in vivo tissue models for drug discovery and transport studies. **J. Pharm. Scienc.**, v. 100, n. 1, p. 59-74, 2011.

FERREIRA, F. R. et al. Desmoplastic melanoma: a diagnostic challenge. **Surgical Cosm Dermatol.**, v. 7, n. 2, 2015.

FILIPPIN, F. B. **Avaliação da atividade citotóxica e melanogênica do complexo de platina (II) com derivado de hidantoína em melanoma.** 2013. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FLETCHER, J. L. et al. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. **Drug Resist Updat.**, v. 26, p. 1-9, 2016.

FRANK, N. Y. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 47156-65, 2003.

FRANK, N. Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. **Cancer Res.**, v. 65, p. 4320-4333, 2005.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell.**, v. 147, p. 992-1009, 2011.

GARBE, C. et al. Curcumin as "Curcumin": From kitchen to clinic. **Bioch. Pharm.**, v. 75, p. 787-809, 2010.

GERETTO, M. et al. Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators. **Am. J. Cancer. Rev.**, v. 7, n. 6, p. 1350-1371, 2017.

GERSHENWALD, J. E. et al. Melanoma staging: evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA Cancer J. Clin.**, v. 67, p. 472-492, 2017.

GU, Y. et al. Inhibition of angiogenesis: a novel antitumor mechanism of the herbal compound arctigenin. **Anti-Canc. Drugs**, v. 24, p. 781-791, 2013.

HALE, C. Skin-melanocytic tumor, Miscellaneous, Breslow's system for tumor thickness. 2013. Disponível em: <http://pathologyoutlines.com/topic/skintumormelanocyticbreslow.html>. Acesso em: 17 jan. 2018.

HE, J. et al. 3D modeling of cancer stem cell niche. **Oncol.**, v. 9, n. 1, p. 1326-1345, 2018.

HEIMERL, S. et al. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. **Melan. Res.**, v. 17, n. 5, p. 265-273, 2007.

HIRSCHHAEUSER, F. et al. Test system for trifunctional antibodies in 3D MCTS culture. **J. Biomol. Screen.**, v. 14, p. 980-990, 2009.

HOARAU-VECHOT, J. et al. Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions?. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n.1, p. 181-203, 2018.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat. Rev.**, v. 13, 2013.

HOLTFRETER, J. A study of the mechanisms of gastrulation. **J. Exp. Zool.**, v. 95, p. 171-212, 1944.

HSIAO, A. Y. et al. 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 109, p. 1293-1304, 2012.

HUANG, Y. et al. Membrane transporters and channels: role of the transporter in cancer chemosensitivity and chemoresistance. **Cancer Res.**, v. 15, p. 4294-301, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Rio de Janeiro, 1996-2018. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao+. Acesso em: 18 jan. 2018.

INDRAN, I. R. et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Bioch et Bioph Acta – Bion.**, v. 1807, n. 6, p. 735-745, 2011.

JARDIM, B. V. et al. Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: an immunohistochemical and molecular study. **Onco Rep.**, v. 30, n. 3, p. 1119-1128, 2013.

JOHNSON, M. M. et al. Skin cancer screening: recommendations for data-driven screening guidelines and a review of the US preventive services task force controversy. **Mel. Manag.**, v. 4, n. 1, p. 13-37, 2017.

KACHALAKI, S. et al. Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. **Eur J Pharm Sci.**, v. 30, n. 89, p. 20-30, 2016.

KAPSE-MISTRY, S. et al. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. **Pharm. Anti-Cancer Drug.**, v. 5, 2014.

KEE, D.; MCARTHUR, G. Immunotherapy of melanoma. **Eur J Surg Oncol.**, 2016.

KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue like structures to be created in vitro. **J. Anat.**, v. 227, p. 746-756, 2015.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, p. 378-386, 2005.

KOOLEN, P. G. L. et al. Recurrence rates over 20 years in the treatment of malignant melanoma: immediate versus delayed reconstruction. **Plast. Reconstr. Surg. Glob.**, v. 5, n. 7, p. 1276, 2017.

KUMAR, D. et al. Therapeutic implications of cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma. **Mol. Canc.**, v. 16, n. 7, 2017.

KUPAS, V. et al. RNAK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated in melanoma-initiating cells. **J Invest Dermatol.**, v. 131, p. 944-955, 2011.

KUPHAL, S.; HAASS, N. K. Cell-cell and cell-matrix contacts in melanoma and the tumor microenvironment. **Springer Verl.**, p. 181-215, 2011.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Life is 3D: boosting spheroid function for tissue engineering. **Trends Biotech.**, v. 35, n. 2, p. 133-144, 2017.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Spheroids as vascularization units: from angiogenesis research to tissue engineering applications. **Biotech. Adv.**, v. 35, n. 6, p. 782-791, 2017

LEE, J. M. et al. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. **Lab Invest.**, v. 93, p. 528-542, 2013.

LEVESQUE, M. P. et al. Metastatic melanoma moves on: translational science in the era of personalized medicine. **Canc. Metast. Rev.**, v. 36, n. 1, p. 7-21, 2014.

LI, Y. J. et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer. **Chin. J. Cancer.**, v. 36, p. 52-62, 2017.

LIN, R. Z. et al. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and beta1-integrin. **Cell. Tissue Res.**, v. 324, p. 411-422, 2006.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotec. J.**, v. 3, p. 1172-1184, 2008.

MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. M. Non-melanoma skin cancer. **Lancet.**, v. 37, p. 673-685, 2010.

MAK, I. W.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. **Ann. J. Transl. Res.**, v. 6, p. 114-118, 2014.

MARTINEZ-CARDUS, A. et al. Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. **Ann. Transl. Med.**, v. 3, n. 15, p. 209-218, 2015.

MARKOVIC, S. N. et al. Malignant melanoma in the 21 st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. **Clin. Proc.**, v. 82, n. 4, p. 490-513, 2007.

MAVERAKIS, E. et al. Metastatic melanoma – a review of current and future treatment options. **Acta Derm Venereol.**, v. 95, p. 516-524, 2015.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of na essential relationship. **Canc. Chem. And Pharm.**, v. 63, n. 4, p. 571-582, 2009.

MCCOURT, C.; DOLAN, O.; GORMLEY, G. Malignant melanoma: a pictorial review. **Ulster Med. J.**, v. 83, n. 2, p. 103-110, 2014.

- MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **J. Control. Release**, v. 164, p. 192-204, 2012.
- MENDES, G. L. Q. Melanoma no Brasil: tendência temporal de mortalidade com modelagem idade-período-corte e análise de sobrevivência em corte hospitalar. Rio de Janeiro, 2014.
- MICHALANY, N. S. Exame Anatomopatológico da lesão primária. In: Melanoma: Prevenção, diagnóstico, tratamento e acompanhamento. 2. Ed. São Paulo: **Atheneu Editora**, p. 161-170, 2014.
- MILANE, L. et al. Multi-modal strategies for overcoming tumor drug resistance: hypoxia, the Warburg effect, stem cells, and multifunctional nanotechnology. **J Control Rel.**, v. 155, p. 237-247, 2011.
- MODOK, S.; MELLOR, H. R.; CALLAGHAN, R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. **Cur. Opin. Pharm.**, v. 6, p. 350-354, 2006.
- MOITRA, K.; LOU, H.; DEAN, M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 89, p. 491-502, 2011.
- MOSCONA, A.; MOSCONA, H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. **J. Anat.**, v. 86, p. 287-301, 1952.
- 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.
- NYBERG, S. L. et al. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. **Liver Transpl.**, v. 11, p. 901-910, 2005.
- OAKLEY, A. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. DermNet NZ. Site da internet. 2016. Disponível em: <http://www.dermnetnz.org/lesions/lentigo-maligna.html>. Acesso em: 14 de janeiro de 2018.
- ONG, C. S. et al. In vivo therapeutic applications of cell spheroids. **Biotch. Adv.**, v. 36, n. 2, p. 494-505, 2018.
- PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 839-845, 2007.
- PAN, S. T. et al. Molecular mechanisms for tumor resistance to chemotherapy. **Clin. Exp. Pharm. And Phys.**, v. 43, p. 723-737, 2016.

- PELTOMAKI, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Exp. Cell. Res.**, v. 318, p. 299-310, 2012.
- PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. **Exp. Cell. Res.**, v. 316, p. 1324-1331, 2010.
- RAGHAVAN, S. et al. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. **Gynecol. Oncol.**, v. 138, p. 181-189, 2015.
- RAMACHANDRAN, C. Doxorubicin resistance in human melanoma cells: MDR-1 and glutathione S-transferase gene expression. **Bioch. Pharm.**, v. 45, n. 3, p. 743-751, 1993.
- RASTRELLI, M. et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 2014.
- RAVI, M. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Jornal of Cell Phys.**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.
- ROBINSON, J. K.; BIGBY, M. Prevention of melanoma with regular sunscreen use. **Jama**, v. 306, n. 3, p. 302-303, 2011.
- RODRIGUES, G. **Eletroquimioterapia para tratamento de câncer – desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ROSS, C. L. et al. MicroRNAs in cutaneous melanoma: role as diagnostic and prognostic biomarkers. **J. Cell. Physiol.**, v. 233, n. 7, p. 5133-5141, 2018.
- SADOZAI, H. et al. Recent successes and future directions in immunotherapy of cutaneous melanoma. **Front. Immunol.**, v. 8, 2017.
- SAMPIERI, K.; FODDE, R. Cancer stem cells and metastasis. **Sem. Canc. Biol.**, v. 22, p. 187-193, 2012.
- SAMPLE, A.; HE, Y. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photoderm. Photoim. Photomed**, v. 34, p. 13-24, 2018.
- SANCHEZ, P. C. F. et al. Melanoma in children, adolescents, and young adults: a clinical pathological study in a brazilian population. **Am. J. Dermat.**, v. 36, p. 620-628, 2014.
- SANDRU, A. et al. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. **J. Med. Life**, v. 7, n. 4, p. 572-576, 2014.

- SANLORENZO, M. et al. Melanoma immunotherapy. **Cancer biol & therap.**, v. 15, n. 6, p.665-674, 2014.
- SANTOS, I.D.A.O.; OLIVEIRA, A.F.O. Tratamento da Lesão Primária. In: Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento. 2. ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, p. 219-225, 2014.
- SCHATTON, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. **Nat.**, v. 451, p. 345-349, 2008.
- SCHWARZ, R. P.; GOODWIN, T. J.; WOLF, D. A. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: Na application of simulated microgravity. **J. Tissue Cult. Methods.**, v. 14, p. 51-57, 1992.
- SCOLYER, R. A.; LONG, G. V.; THOMPSON, J. F. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. **Mol. Oncol.**, v. 5, n. 2, p. 124-136, 2011.
- SEKULIC, A. et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. **Clin. Proc.**, v. 83, n. 7, p. 825-846, 2008.
- SETIA, N. et al. Profiling of ABC transporters ABCB5, ABCF2 and nestin-positive stem cells in nevi, in situ and invasive melanoma. **Mod Pathol.**, v. 25, p. 1169-1175, 2012.
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nat Rev Cancer.**, v. 16, n. 6, p. 345-358, 2016.
- SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmac.**, v. 8, p. 105-127, 2008.
- SIENA, A. D. G. **Análise da expressão de RNAs longos não-codificadores em linhagens celulares de melanoma em diferentes estágios de progressão tumoral.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- SINGH, B. P.; SALAMA, A. K. Updates in therapy for advanced melanoma. **Cancers**, v. 8, n. 1, 2016.
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 16, n. 6, p. 345-358, 2016.
- SODANI, K. et al. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. **Chin. J. Cancer.**, v. 31, n. 2, p. 58-73, 2012.
- SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nat. Nanotechnol.**, v. 5, p. 291-296, 2010.

- SUN, Y. L. et al. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. **Chin. J. Cancer.**, v. 31, n. 2, p. 51-57, 2012.
- SZAKACS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nat. Rev.**, v. 5, p. 219-234, 2006.
- TAKENAKA, S.; ITOH, T.; FUJIWARA, R. Expression pattern of human ATP-binding cassette transporters in skin. **Pharm. Res. Persp.**, v. 1, n. 1, 2013.
- TIWARI, A. K.; AN, X.; CHEN, Z. S. The role of stem cell markers in multidrug resistance mediated by ABC transporters. **Leuk Res.**, v. 34, n. 6, p. 696-697, 2011.
- TOKUDA, E. Y.; JONES, C. E.; ANSETH, K. S. PEG-peptide hydrogels reveal differential effects of matrix microenvironmental cues on melanoma drug sensitivity. **Integr. Biol.**, 2017.
- TOMAS, R. P. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. **Cur. Med. Chem.**, v. 13, p. 1859-1876, 2006.
- TRINH, N. V. et al. Taraxacum officinale dandelion extracts efficiently inhibited the breast cancer stem cell proliferation. **Biomed. Res. Therap.**, v. 3, n. 7, p. 733-741, 2016.
- TSENG, H. et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Eng. Part. C. Methods.**, v. 19, p. 665-675, 2013.
- TUNG, Y. C. et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. **Analyst.**, v. 136, p. 473-478, 2011.
- UONG, A.; ZON, L. I. Melanocytes in development and cancer. **J. Cell Physiol.**, v. 222, p. 38-41, 2010.
- VASILIOU, V.; VASILIOU, K.; NEBERT, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. **Hum. Gen. Rev.**, v. 3, n. 3, p. 281-290, 2009.
- VÁSQUEZ-MOCTEZUMA, I. et al. ATP-binding cassette transporter ABCB5 gene is expressed with variability in malignant melanoma. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 101, p. 341-348, 2010.
- VEELKEN, C. et al. Single cell-based automated quantification of therapy responses of invasive cancer spheroid in organotypic 3D culture. **Meth.**, v. 128, p. 139-149, 2017.
- VINCI, M. et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biol.**, v. 10, n. 29, p. 10-29, 2012.

VIROS, A. et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. **Plos Med.**, v. 5, n. 6, p. 120, 2008.

VORSMANN, H. et al. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. **Cell. Death Dis.**, v. 4, n. 7, p. 7-19, 2013.

VULTUR, A. HERLYN, M. SnapShot: Melanoma. **Cancer Cell.**, v. 23, n. 5, p. 706-706, 2013.

XIA, C. Q.; SMITH, P. G. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. **Mol. Pharm.**, v. 82, n. 6, p. 1008-1021, 2012.

YATES, L. R.; CAMPBELL, P. J. Evolution of the cancer genome. **Nat. Ver. Genet.**, v. 13, n. 11, p. 795-806, 2012.

WANG, P. et al. Overcome cancer cell drug resistance using natural products. **Evid. Based Compl; Alternat. Med.**, v. 2015, 2015.

WANG, J. et al. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. **Oncol.**, v. 8, n. 48, p. 84559-84571, 2017.

ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scient. Rep.**, v. 6, 2016.

Apêndice 1 – (Artigo 1) Análise da expressão gênica do transportador ABCB5 e sua associação com a resistência a múltiplas drogas em melanoma cutâneo humano: uma revisão sistemática

Autores: Letícia Cristine de Faria; Lídia Andreu Guillo

Anais Brasileiros de Dermatologia (submetido)

Apêndice 2 – (Artigo 2) Temporal variations in ABCB1 and ABCB8 gene expression in tridimensional cultures of human melanoma cells

Autores: Letícia Cristine de Faria; Lídia Andreu Guillo

Archives of Dermatological Research (submetido)

Análise da expressão gênica do transportador ABCB5 e sua associação com a resistência a múltiplas drogas em melanoma cutâneo humano: uma revisão sistemática

Letícia Cristine de Faria¹; Lídia Andreu Guillo¹

¹Instituto de Ciências Biológicas II, Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

Autor correspondente: Letícia Cristine de Faria
E-mail: letscri@gmail.com
Tel.: (+55) (62) 98180 2121

Resumo: Melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele sendo considerado agressivo devido sua evolução rápida, alta predisposição para metástase e a baixa eficácia dos atuais tratamentos em estágios avançados. O mau prognóstico resulta principalmente da resistência intrínseca aos quimioterápicos com a capacidade de conferir resistência a múltiplas drogas (MDR). Dentre os diversos mecanismos relacionados ao fenótipo de MDR, o melhor caracterizado envolve a expressão da superfamília de transportadores do tipo ABC, dependente de ATP, identificados como facilitadores do efluxo de drogas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar evidências científicas via revisão sistemática de literatura sobre a expressão gênica do transportador ABCB5 em casos de melanoma cutâneo humano e sua associação com a resistência a múltiplas drogas.

Palavras-chave: Expressão gênica, genes MDR, melanoma, resistência a múltiplos medicamentos, transportadores de cassetes de ligação

1. Introdução

O melanoma é um tumor maligno originado a partir da perda do controle de proliferação dos melanócitos (células responsáveis pela produção de melanina) e encontram-se principalmente na pele e nos olhos.^{1,2} É uma doença multifatorial e os mecanismos que conduzem à transformação maligna de melanócitos ainda são mal compreendidos. No desenvolvimento de melanoma maligno, existe uma interação entre fatores exógenos (ambientes) e endógenos (genéticos e imunológicos).³

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, o melanoma cutâneo representa apenas 4% do total de doenças malignas cutâneas. Entretanto, apesar de ter uma incidência relativamente baixa, assume grande importância devido ao seu elevado potencial de gerar metástase e sua alta taxa de letalidade.^{4,5}

A quimioterapia é uma das abordagens mais eficazes para o tratamento de muitos tipos de tumores malignos, especialmente nos casos de câncer metastáticos.⁶ A eficácia da quimioterapia é um dos principais desafios no tratamento do câncer para alcançar a remissão duradoura e uma

cura definitiva.⁷ A quimiorresistência é o principal obstáculo na eficácia das terapias contra o câncer, pois permite que as células cancerígenas sobrevivam ao tratamento e proliferam descontroladamente.⁸

O tratamento do melanoma primário sem qualquer evidência de metástases é a excisão cirúrgica com ampla margem de segurança. No entanto, o melanoma metastático é altamente resistente às terapias convencionais, como radioterapia e quimioterapia, podendo conferir resistência simultânea a várias drogas farmacologicamente e estruturalmente distintas. Este mecanismo é conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR).^{9,10}

Dentre os diversos mecanismos relacionados à MDR em células de melanoma cutâneo, o melhor caracterizado envolve a expressão de um grupo de facilitadores do efluxo de vários substratos através da membrana plasmática, incluindo drogas antineoplásicas: transportadores ABC (*ATP-binding cassette*).^{9,11,12} A superfamília dos transportadores ABC consiste em 48 membros e são classificados em sete subfamílias de ABC-A e ABC-G com base em similaridades de sequências e organização estrutural.^{11,13}

Os transportadores ABC são definidos pela sua estrutura básica, consistindo em dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD) e dois domínios transmembrana (TMD). Estes transportadores medeiam o transporte de substratos através da membrana celular, contra um gradiente de concentração. O reconhecimento e ligação do substrato ocorrem nos TMD e os dois NBD se ligam ao ATP. As moléculas de ATP serão hidrolisadas em ADP, causando uma mudança conformacional na estrutura da proteína, separando os dois NBD, permitindo que o substrato seja exportado para o meio extracelular.^{7,14,15}

Identificar transportadores ABC que são responsáveis pela resistência no melanoma cutâneo é essencial para compreender os complexos mecanismos de quimiorresistência neste câncer. Atualmente, sabe-se que um aglomerado de transportadores ABC é expresso em melanoma cutâneo, dentre eles o ABCB5.¹⁶ O transportador ABCB5 está associado à progressão clínica do tumor, à resistência terapêutica e à recorrência em pacientes com câncer, inclusive no melanoma cutâneo.¹⁶⁻¹⁹

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão gênica do transportador ABCB5 em casos de melanoma cutâneo e sua associação com a resistência a múltiplas drogas via revisão sistemática de literatura.

2. Metodologia

Pesquisa em Bases de Dados

Foram selecionados estudos nas seguintes bases de dados: PubMed e Scielo. Não houve restrições concernentes a idiomas e período de busca. Utilizou-se os seguintes descritores para busca: "*ATP-binding cassette AND melanoma*"; "*ABCB5 transporter*"; "*ABCB5 AND melanoma*".

Coleta e Análise de Dados

Os estudos foram selecionados e avaliados por uma única pessoa, obedecendo aos critérios previamente estipulados de inclusão e exclusão que estão contidos no Teste de Elegibilidade I, que foi aplicado apenas ao resumo dos artigos, e ao Teste de Elegibilidade II, aplicado ao artigo na íntegra a partir dos estudos previamente selecionados pelo Teste de Elegibilidade I.

Teste de Elegibilidade I: os resumos dos artigos foram avaliados, sendo incluídos os artigos que realizaram a análise da expressão do transportador ABCB5 em amostras de melanoma. Os artigos excluídos através deste teste foram os que não disponibilizaram resumos nas bases de dados ou que a análise da expressão do transportador ABCB5 foi realizada por meio de células iniciadoras de tumores.

Teste de Elegibilidade II: os artigos selecionados foram analisados na íntegra, sendo incluídos os artigos que estavam disponíveis para leitura e artigo que analisaram a expressão gênica do transportador ABCB5, bem como a sua associação com a MDR em amostras de melanoma cutâneo humano. Artigos de revisão ou estudos que investigaram o polimorfismo do gene ABCB5 foram excluídos desta análise.

Dos artigos selecionados, foram extraídos dados da publicação, bem como o perfil de expressão gênica do transportador ABCB5 e sua relação com a MDR em casos de melanoma cutâneo humano.

3. Resultados

Não foram encontrados estudos na base de dados Scielo.

Utilizando a base de dados PubMed foram encontrados 487 artigos, sendo que 95 artigos estavam repetidos entre os descritores utilizados, restando 392 artigos para serem aplicados no Teste de Elegibilidade I. Apenas 51 artigos atendiam aos critérios de inclusão do Teste de Elegibilidade I, os demais não investigaram a expressão do transportador ABCB5 no melanoma cutâneo (313), não disponibilizaram o resumo para análise (17) ou a investigação da expressão do ABCB5 foi realizada em células iniciadoras de tumores (11).

Já na fase de coleta dos dados, após a aplicação do Teste de Elegibilidade II, 49 artigos foram excluídos, pois não analisaram a expressão gênica do transportador ABCB5 (30), eram artigos de revisão (04), investigaram o polimorfismo do gene ABCB5 (03), não estavam disponíveis na íntegra (02) ou a investigação da expressão do gene ABCB5 não estava associada à MDR. Portanto, apenas 11 estudos foram selecionados para análise após a aplicação dos dois testes de elegibilidade (quadro 1).

Autores	Título	Ano de publicação	Fonte de publicação
Frank et al.	Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter	2003	J Biol Chem, v. 278, n. 47, p. 47156-47165
Huang et al.	Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance	2004	Cancer Res, v. 64, n. 12, p. 4294-4301
Frank et al.	ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma	2005	Cancer Res, v. 65, n. 10, p. 4320-4333
Heimerl et al.	Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells	2007	Melanoma Res, v. 17, n.5, p.265-

			273
Elliot; Al-Hajj	ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome	2009	Mol Cancer Res, v. 7, n. 1, p. 79-87
Moctezuma et al.	ATP-binding cassette transporter ABCB5 gene is expressed with variability in malignant melanoma	2010	Actas Dermosifiliogr, v. 101, n.4, p. 341-348
Chartrain et al.	Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells	2012	Plos One, v. 7, n. 5, p. 36762
Reid et al.	Markers of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with melanoma correlate with disease recurrence and progression	2013	Br J Dermatol, v. 168, n. 1, p. 85-92
Wozniak et al.	Parthenolide complements the cell death-inducing activity of doxorubicin in melanoma cells	2013	Anticancer Res, v. 33, n. 8, p. 3205-3212
Wilson et al.	ABCB5 maintains melanoma-initiating cells through a proinflammatory cytokine signaling circuit	2014	Cancer Res, v. 74, n. 15, p. 4196-4207
Salgado et al.	Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1	2018	Toxicol In Vitro, v. 50, p. 40-46

Quadro 1: Artigos selecionados após aplicação do Teste de Elegibilidade

4. Discussão

Expressão gênica do transportador ABCB5 em células de melanoma cutâneo humano

O gene ABCB5 é alvo de pesquisas envolvendo MDR em células de melanoma cutâneo humano devido suas propriedades de conferir quimiorresistência e malignidade ao melanoma.^{16, 20,21} Os dois primeiros estudos moleculares envolvendo a expressão gênica do transportador ABCB5 no melanoma foram realizados por Frank et al.^{20,22} Os primeiros resultados encontrados por eles identificaram a pele como o principal tipo de tecido para a expressão do gene ABCB5.²⁰ Heimerl et al. através de um estudo envolvendo a expressão gênica de todos os transportadores ABC conhecidos em linhagens celulares derivadas de melanócitos normais, melanoma primário e melanoma metastático, forneceram uma visão

abrangente em relação aos níveis de expressão destes transportadores.²³ Resultados semelhantes foram encontrados por Frank et al. que identificaram alta expressão do gene ABCB5 em melanócitos normais.²⁰

Após a identificação da expressão gênica do transportador ABCB5 em melanócitos, pesquisadores buscaram analisar o perfil de expressão deste gene em melanoma primário e metastático. Segundo um estudo realizado por Huang et al., onde estes investigaram a expressão gênica do transportador ABCB5 em 08 linhagens celulares derivadas de melanoma primário, este gene foi seletivamente expresso em 06 das 08 linhagens celulares de melanoma estudadas, sugerindo um papel específico desse transportador na quimiorresistência do melanoma.²¹ Frank et al. além de identificar a expressão do gene ABCB5 em células de melanócitos normais, também apontaram a expressão deste gene em linhagens celulares de melanoma cutâneo.²² Resultados semelhantes foram encontrados por Moctezuma et al. que detectaram o gene ABCB5 altamente expresso em 90% das amostras de melanoma cutâneo analisadas por RT-qPCR.²⁴

As informações em relação ao padrão de expressão do gene ABCB5 e sua função ainda são bastantes limitadas e apresentam bastantes controvérsias entre os pesquisadores. Enquanto alguns estudos identificaram alto nível de expressão gênica do transportador ABCB5 em melanoma cutâneo humano ^{21,22,24}, outros identificaram baixa ou nenhuma expressão deste mesmo transportador em amostras de melanoma primário e metastático. Elliot e Al-Hajj fizeram análise da expressão gênica do transportador ABCB5 por meio da técnica de RT-qPCR e encontraram níveis de expressão relativamente baixos do gene ABCB5 em comparação com os níveis de expressão de outros transportadores da família ABC.²⁵ Através da análise molecular da expressão gênica de vários transportadores ABC, Heimerl et al. identificaram que os níveis de expressão do gene ABCB5 foram diminuídos em mais de duas vezes em linhagens celulares provenientes de melanoma primário e metastático em comparação com os melanócitos normais. Segundo esses pesquisadores, uma diminuição do nível de expressão gênica do transportador ABCB5 pode ser correlacionado com a perda de funções específicas dos melanócitos durante o processo de

melanogênese, uma vez que este transportador é abundantemente expresso em células de melanócitos normais.²³

Relação entre a expressão do gene ABCB5 e o grau de evolução do melanoma

No melanoma, assim como em outros tumores malignos, o processo de quimiorresistência é resultado de complexos mecanismos que envolvem diferentes estratégias moleculares, grau de progressão tumoral, comportamento clínico patológico e características do hospedeiro.²⁶ Estudos apontam para a relação direta entre a expressão do gene ABCB5 e o grau de patogenicidade, resistência terapêutica e à recorrência do tumor nos casos de melanoma cutâneo.^{16,17,27}

Moctezuma et al. encontraram um menor nível de expressão do gene ABCB5 em amostras de melanoma nos estágios iniciais e intermediários quando comparado com os níveis de expressão do gene ABCB5 em amostras de melanoma metastático.²⁴ Resultados semelhantes foram encontrados por Chartrain et al. que ao analisarem várias linhagens celulares de melanoma cutâneo, observaram que os níveis de expressão do gene ABCB5 em células de linhagens celulares originadas de melanoma metastático é significativamente maior em comparação com os níveis de expressão deste gene em linhagens celulares derivadas de melanoma primário.¹⁸ Foi mostrado anteriormente por Schatton et al. que o nível de expressão de ABCB5 está correlacionado com o grau de melanoma.¹⁶ Assim como Reid et al. observaram que o gene ABCB5 foi significativamente mais propenso a ser expresso em amostras de pacientes em estágios avançados (estágios III e IV; 42% e 51%, respectivamente) do que em amostras de pacientes em estágio inicial (estágio 0 e II; 23% e 33%, respectivamente).²⁸

O aumento do nível de expressão do gene ABCB5 em amostras de células de melanoma cutâneo correlaciona-se positivamente com a progressão neoplásica, sugerindo que a expressão de ABCB5 está associada à agressividade do tumor.

Quimiorresistência causada pela expressão gênica do transportador ABCB5

O primeiro transportador da família ABC a ser identificado foi o ABCB1, também conhecido por glicoproteína-P. Após a sua identificação, vários outros transportadores associados à resistência a múltiplas drogas foram identificados, tal como o ABCB5.^{29,30} Estudos observaram que a sequência do gene ABCB5 é homóloga a 73% da sequência do gene ABCB1.^{20,26} Como o gene ABCB1 é expresso em melanoma cutâneo e sua ação está relacionada ao efluxo de doxorubicina,³⁰ Frank et al. hipotetizaram que o transportador ABCB5, assim como o transportador ABCB1, estaria envolvido na mediação à resistência a drogas em células de melanoma cutâneo humano, uma vez que o melanoma é altamente resistente ao tratamento com doxorubicina.²²

O melanoma é considerado refratário aos efeitos antitumorais da doxorubicina e, portanto, essa droga não é utilizada atualmente na terapia de melanoma na clínica. Os mecanismos clínicos de resistência do melanoma à doxorubicina são incertos. No entanto, Frank et al. observaram através do estudo com várias linhagens de melanoma cutâneo, que amostras de melanoma cutâneo que expressam o gene ABCB5 exibiram uma menor acumulação intracelular de doxorubicina em comparação com as células que apresentaram baixo nível de expressão do gene ABCB5, demonstrando que este transportador atua no mecanismo de efluxo celular da doxorubicina.²²

Wozniak et al. observaram que o alto nível de expressão do gene ABCB5 na linhagem A-375 de melanoma cutâneo casou um maior efluxo da doxorubicina, conseqüentemente reduziu sua concentração e eficácia intracelular, quando comparado com o nível de expressão de outras linhagens celulares derivadas de melanoma. Além disso, esse estudo demonstrou que o tratamento das células de melanoma com doxorubicina gerou um aumento dos níveis de expressão do transportador ABCB5.³¹

Wilson et al. realizaram uma análise para avaliar o papel funcional do transportador ABCB5 como um mediador multirresistente no melanoma em relação a vários agentes quimioterápicos, dentre eles a doxorubicina. Portanto, eles inibiram o gene ABCB5 por meio de RNA de interferência ou

anticorpo monoclonal, e observaram que essa inibição resultou em reversão significativa de quimiorresistência a doxorubicina em 3 vezes, demonstrando que o ABCB5 atua na mediação à resistência a doxorubicina em melanoma.²⁷ Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente por Frank et al. que com o objetivo de elucidar o mecanismo pelo qual o transportador ABCB5 confere resistência à doxorubicina, silenciaram a atividade deste gene, resultando em uma maior acumulação da droga no meio intracelular, demonstrando que o ABCB5 atua como um transportador de efluxo de doxorubicina.²²

As células de melanoma que expressam o gene ABCB5 além de serem sobreviverem quando expostas a doxorubicina, podem também sobreviver com outros fármacos utilizados no tratamento do melanoma, tais como: paclitaxel, teniposídeo, docetaxel, etoposídeo, vincristina, dacarbazina, vemurafenib e várias outras, devido ao fato da atividade do transportador ABCB5 está correlacionado de forma positiva com a resistência do melanoma para essas drogas.^{27,32}

De fato, o transportador ABCB5 atua no mecanismo de resistência a múltiplas drogas em melanoma cutâneo. No entanto, há possibilidades de reversão da quimiorresistência mediada pelo bloqueio do ABCB5 ou através de novas abordagens envolvendo imunoterapia dirigida à deleção de células tumorais que expressam o gene ABCB5. Esses avanços podem aumentar a erradicação tumoral no melanoma cutâneo e contribuir para produzir respostas clínicas mais eficazes e duradouras em relação às estratégias terapêuticas dirigidas predominantemente a população em massa de células tumorais.

5. Conclusão

Através dos dados encontrados via revisão sistemática de literatura, conclui-se que a expressão gênica do transportador ABCB5 varia entre as linhagens celulares derivadas de melanoma cutâneo, uma vez que em alguns estudos foi possível detectar a presença deste transportador em células de melanoma, enquanto em outros estudos utilizando diferentes linhagens, o gene ABCB5 não foi expresso.

A expressão gênica do transportador ABCB5 está diretamente relacionada ao mecanismo de resistência a múltiplas drogas no melanoma cutâneo, sendo responsável pelo efluxo de várias drogas, principalmente a doxorubicina.

Referências

1. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:345-58.
2. Sadozai H, Gruber T, Hunger RE, Schenk M. Recent successes and future directions in immunotherapy of cutaneous melanoma. *Front Immunol*. 2017;8:1617.
3. Sanchez PC, Noda AY, Franco DD, Lourenço SV, Sanguenza M, Neto CF. Melanoma in children, adolescents, and young adults: a clinical pathological study in a Brazilian population. *Am J Dermatopathol*. 2014;36:620-8.
4. SinghBP, Salama AK. Updates in therapy for advanced melanoma. *Cancers*. 2016;8:47.
5. Inca [Internet]. Câncer de pele tipo melanoma [acesso 25 jun 2018]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao+.
6. Chen KG, Gottasman MM. How melanoma cells evade chemotherapy: role of transporter-dependent and independent resistance mechanisms. In: Hearing VJ, Leong SPL, editors. *From melanocytes to melanoma: the progression to malignancy*. Totowa: Humana Press; 2006. P. 591-603.
7. Begicevic RR, Falasca M. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. *Int J Mol Sci*. 2017;18:122.
8. Geretto M, Pulliero A, Rosano C, Zhabayeva D, Bersimbaev R, Izzotti A. Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators. *Am J Cancer Res*. 2017;7:1350-1371.
9. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C *et al*. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*. 2016;370:153-164.
10. Wang J, Seebacher N, Shi H, Kan Q, Duan Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget*. 2017;8:84559-84571.
11. Xia CQ, Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol*. 2012;82:1008-1021.
12. Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2014;5:159.

13. Szakács G, Paterson JK, Ludwing JÁ, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Ver Drug Discov.* 2006;5:219-34.
14. Tiwari AK, Na X, Chen ZS. The role of stem cell markers in multidrug resistance mediated by ABC transporters. *Leuk Res.* 2011;34:696-697.
15. Sun YL, Patel A, Kumar P, Chen ZS. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chin J Cancer.* 2012;31:51-7.
16. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M *et al.* Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* 2008;451:345-9.
17. Kupas V, Weishaupt C, Siepmann D, Kaserer ML, Eickelmann M, Metze D *et al.* RANK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated on melanoma-initiating cells. *J Invest Dermatol.* 2011;131:944-55.
18. Chartrain M, Rioud J, Stennevin A, Vandenberghe I, Gomes B, Lamant L, Meyer N *et al.* Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *Plos One.* 2012;7:36762.
19. Setia N, Abbas O, Sousa Y, Garb JL, Mahalingam M. Profiling of ABC transporters ABCB5, ABCF2 and nestin-positive stem cells in nevi, in situ and invasive melanoma. *Mod Pathol.* 2012;25:1169–75.
20. Frank NY, Pendse SS, Lapchak PH, Margaryan A, Shlain D, Doeing C *et al.* Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem.* 2003;278:47156–65.
21. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z *et al.* Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* 2004;15:4294-301.
22. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M *et al.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 2005;15:4320-33.
23. Heimerl S, Bosserhoff AK, Langmann T, Ecker J, Schmitz G. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res.* 2007;17:265-73.
24. Vásquez-Moctezuma I, Meraz-Ríos MA, Villanueva-López CG, Magaña M, Martínez-Marcias R, Sánchez-González DJ, García-Sierra F *et al.* ATP-binding cassette transporter ABCB5 gene is expressed with variability in malignant melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101:341-8.
25. Elliot AM, Al-Hajj MA. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. *Mol Cancer Res.* 2009;7:79-87.
26. Chen KG, Valencia JC, Gillet JP, Hearing VJ, Gottesman MM. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:740-749

27. Wilson BJ, Saab KR, Ma J, Schatton T, Putz P, Zhan Q et al. ABCB5-maintains melanoma-initiating cells through a proinflammatory cytokine signaling circuit. *Cancer Res.* 2014;74:4196-207.
28. Reid AL, Millward M, Pearce R, Lee M, Frank MH, Ireland A et al. Markers of circulating tumour cells in the peripheral blood of patients with melanoma correlate with disease recurrence and progression. *Br J Dermatol.* 2013;168:85-92.
29. Moitra K, Lou H, Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Opin Pharm.* 2011;89:491-502
30. Basu R, Baumgaertel N, Wu S, Kopchick JJ. Growth hormone receptor knockdown sensitizes human melanoma cells to chemotherapy by attenuating expression of ABC drug efflux pumps. *Horm Cancer.* 2017;8:143-156.
31. Wozniak M, Szulawska-Mroczek A, Hartman ML, Nejc D, Czyz M. Parthenolide complements the cell death-inducing activity of doxorubicin in melanoma cells. *Anticancer Res.* 2013;33:3205-12.
32. Salgado SYC, Ferreira BM, Luz ZJ, Filipak-Neto F, Ribeiro OCA. Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1. *Toxicol In Vitro.* 2018;50:40-46.

Temporal variations in ABCB1 and ABCB8 gene expression in tridimensional cultures of human melanoma cells

Letícia Cristine de Faria¹; Lídia Andreu Guillo¹

¹Institute of Biological Sciences II, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, Goiânia-GO, Brazil.

Corresponding author: Letícia Cristine de Faria

E-mail: letscri@gmail.com

Phone number: +55 62 981802121

Abstract

Human cutaneous melanoma is a highly aggressive cancer due to metastatic potential. Chemotherapy treatment for cutaneous melanoma is often limited by the development of multiple drug resistance mechanisms. Three-dimensional (3D) *in vitro* models are a valuable tool because they mimic the complexity of the tumour microenvironment *in vivo*, permitting the analysis of molecular mechanisms involved in tumour chemoresistance. This study analyzed the expression profile of ABCB1 and ABCB8 transporters from cutaneous melanoma cells in a 3D culture model. The cell lines SKMEL-37 and A-375 were used to form spheroids in low attachment surface microplates of cell cultures. The formation and growth of spheroids was monitored throughout the 10 days incubation period. The level of ABCB1 and ABCB8 gene expression was performed using the real-time qRT-PCR technique and quantified using the delta-delta CT ($\Delta\Delta CT$) method. Our results demonstrated that 3D culture models in low cell attachment surface microplates have a high yield and efficiency in spheroid formation and growth. The ABCB1 and ABCB8 genes were expressed in the spheroids formed by both SKMEL-37 and A-375 cells. We detected a significant increase ($p \leq 0.05$) in the level of expression of these genes in the two cell lines studied, as the spheroid incubation period proceeded. We concluded that through the formation of 3D cutaneous melanoma cells structures it was possible to analyze the expression profile of the ABCB1 and ABCB8 transporters, providing the baseline for future analysis of the role of these transporters in the resistance to multiple drugs in cutaneous melanoma.

Keywords: 3D culture, ATP-binding cassette transporter, cutaneous melanoma, genes MDR, spheroids.

1. Introduction

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer. This neoplasm originates from an uncontrolled proliferation of melanocytes, which are the cells responsible for the production of melanin [21,25]. Although cutaneous

melanoma has a relatively low incidence compared to other types of skin cancer, it is of great importance due to its high potential to metastasize and mortality rate [26]. When the melanoma is diagnosed early without any evidence of metastasis, wide surgical excision with a safety margin is the treatment of choice [20]. However, metastatic melanoma presents a low chance of cure due to its resistance to conventional therapies [2, 20,22]. Generally, melanoma has low sensitivity to cytotoxic agents and may develop a multiple drug resistance (MDR), which hampers the efficacy of the treatment [5].

Amongst the various mechanisms associated to the MDR phenotype in human cancer cells, the expression of the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters is the best characterized. The ABC transporters are well-known facilitators of the efflux of various substances through the plasma membrane, including antineoplastic drugs, preventing the accumulation of these drugs in the intracellular environment [6,12,28]. Several ABC transporters are expressed in cutaneous melanoma cells, including ABCB1 and ABCB8 [3,8,24]. The presence of these transporters is negatively correlated with clinical efficacy response to therapies. Therefore, it is important to evaluate the expression of these transporters to aid in the selection of an appropriated treatment [27,28].

The most usual and common approach of cancer research is the use of animal models to test therapeutic treatments. However, the use of animal models cannot efficiently predict the efficacy of the test when compared to humans and is also limited due to ethical issues [7,9,11]. These limitations encouraged researchers to develop *in vitro* models for the study of cell biology and physiology [9,19]. Two-dimensional (2D) cell culture is the conventional methodology used in the study of *in vitro* mammalian cells. Although 2D models have significantly advanced our understanding in biological research, it has certain limitations because it does not realistically replicate all mechanical and biochemical signals, as well as the genetic and morphological profile present in the cell *in vivo* [1,4,9,14,17].

To reduce the use of animals in research and overcome the experimental limitations from 2D culture, novel three-dimensional (3D) cell culture methods have been proposed [18]. When compared to 2D culture, the

3D environment has the advantage of better mimicking the *in vivo* tumour microenvironment, providing more realistic physiological and biological conditions due to the cell-cell and cell-extracellular matrix interactions [13,15]. The 3D cell cultures grow into *in vitro* spheroids that fills the gap between the use of 2D cultures and *in vivo* animal models, proving to be a reliable model for several types of analysis. Multiple drug resistance in cutaneous melanoma presents a major obstacle to successful treatment and it is therefore imperative to search for models that contribute to the understanding of the mechanisms involved in tumour chemoresistance. Thus, in this study, the profile of the gene expression of the ABCB1 and ABCB8 transporters from 3D cultures of human cutaneous melanoma cells was analyzed.

2. Materials and methods

2.1 Two-dimensional (2D) cell culture

The human cutaneous melanoma cells lines SKMEL-37 and A-375 were maintained in MEM (Vitrocell-Embriolife) and DMEM (Gibco, Life Technologies) culture medium, respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco- Invitrogen), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco-Invitrogen) and 0.25 µg/ml Fungizone (Gibco-Invitrogen). The cell cultures were kept in a humid incubator at 37°C with 5% CO₂.

2.2 Three-dimensional (3D) cell culture

Nunclon Sphera 96-well plates (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) were used for the formation of spheroids culture. The Nunclon Sphera plate is designed to cause minimal attachment of cells to the culture vessel, allowing the aggregation of cells. For the formation of spheroids from the cell lines A-375 and SKMEL-37, cell suspensions at densities of 5×10^3 and 1×10^4 in 200 µl of MEM (SKMEL-37 cells) and DMEM (A-375 cells) media, supplemented with 10% FBS, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin and

0.25 µg/ml Fungizone, were transferred to each well of the Nunclon Sphera plate. The microplate was centrifuged at 250 xg for 5 minutes and incubated at 37°C and 5% CO₂. For the maintenance of the spheroids, 100 µl of culture medium from each well was replenished with 100 µl of fresh medium every 48 hours of incubation. After the spheroid formation period (72 hours), the growth and maturation were followed for 7 days, totaling 10 days of incubation. The spheroids were withdrawn at certain periods (72 hours, on the 4th and 7th day after their formation) and stored at -20°C for future extraction of RNA.

2.3 Extraction of RNA and synthesis of cDNA

The total RNA of spheroids was isolated using the commercial RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The concentration of extracted RNA was quantified with a Qubit fluorometer (Invitrogen), following the instructions of the Quant-it RNA Assay kit (Qiagen). After quantification, the RNA was stored at -20°C.

The synthesis of cDNA was performed using the commercial ThermoScript RT-PCR System kit (Invitrogen). Initially, 132 ng of RNA, 50 ng/µl Random-hexamer primer, 10 mM dNTP mix and DEPC-treated water were added to the Eppendorf tube, making up to a final volume of 12 µl. The reaction was incubated for 5 minutes at 65°C. Subsequently, it was added a master mix containing 5x buffer for the synthesis of cDNA, 0.1 M DTT, 40 U/µl RNaseOUT, 15 U/µl ThermoScript enzyme and DEPC-treated water to make up a final volume of 20 µl. The reaction was incubated at 25°C for 10 minutes, at 50°C for 50 minutes and at 85°C for 5 minutes. Afterwards, RNase H was added and the samples were incubated at 37°C for 20 minutes. The synthesized cDNA from each sample was stored at -20°C.

2.4 Real-time qRT-PCR reactions

Real-time qRT-PCR reactions were performed in an iCycler IQ5 (BioRad, France) using a fluorescent dye SYBR Green (MasterMix RT-PCR

– Green SYBR 2x, Quatro G P&D Ltda, Brazil). Primer sequences of the transporters ABCB1 (forward 5'-GCTGTCAAGGAAGCCAATGCCT-3', reverse 5'-TGCAATGGCGATCCTCTGCTTC-3'), ABCB8 (forward 5'-CCTGCTTATCCTCTATGGTGTCC-3', reverse 5'-GCCCTGTCTTATTGGCGTCAAAG-3') and the constitutive gene GAPDH (forward 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', reverse 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3') were obtained from the OriGene Technologies collection. The cycle conditions of the qRT-PCR assays were an initial denaturation at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 15 seconds) and annealing/extension (60°C for 1 minute). After the amplification, a dissociation curve was performed in 81 cycles, beginning at 55°C for 30 seconds and subsequently increasing the temperature to 95°C at 0.5°C/second to ensure the specificity of the amplification.

For each gene, the level of expression of the target gene was quantified using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method.

2.5 Statistical Analysis

The results were plotted based on the average \pm SD from each of the three independent experiments. Data analysis was performed through One Way ANOVA, followed Tukey post-tests. The differences were considered significant when $p\leq 0.05$. All analyzes were performed using *GraphPad Prism* software version 5.0.

3. Results

3.1 Formation of spheroids on low cell attachment surface plate

The A-375 and SKMEL-37 cells cultured in the Nunclon Sphera plate started to aggregate after 24 hours of incubation, initiating the process of formation of spheroids. After 48 hours of incubation, the aggregated cells began to compact due to interactions and intercellular contacts. At the end of 72 hours of incubation, the multicellular aggregates formed compacted

spheroids with defined borders (Fig. 1). Therefore, this time was defined as control (time 0).

The morphology of the spheroids were different between the two cell lines. The A-375 cells tended to form more even spherical structures (figure 1A, B), whereas the SKMEL-37 cells had more asymmetrical shapes (Fig. 1c,d). Due to the increased compaction of cells over time, the size of the spheroids incubated for 72 hours was smaller compared with the 24 hours spheroids (Fig. 1).

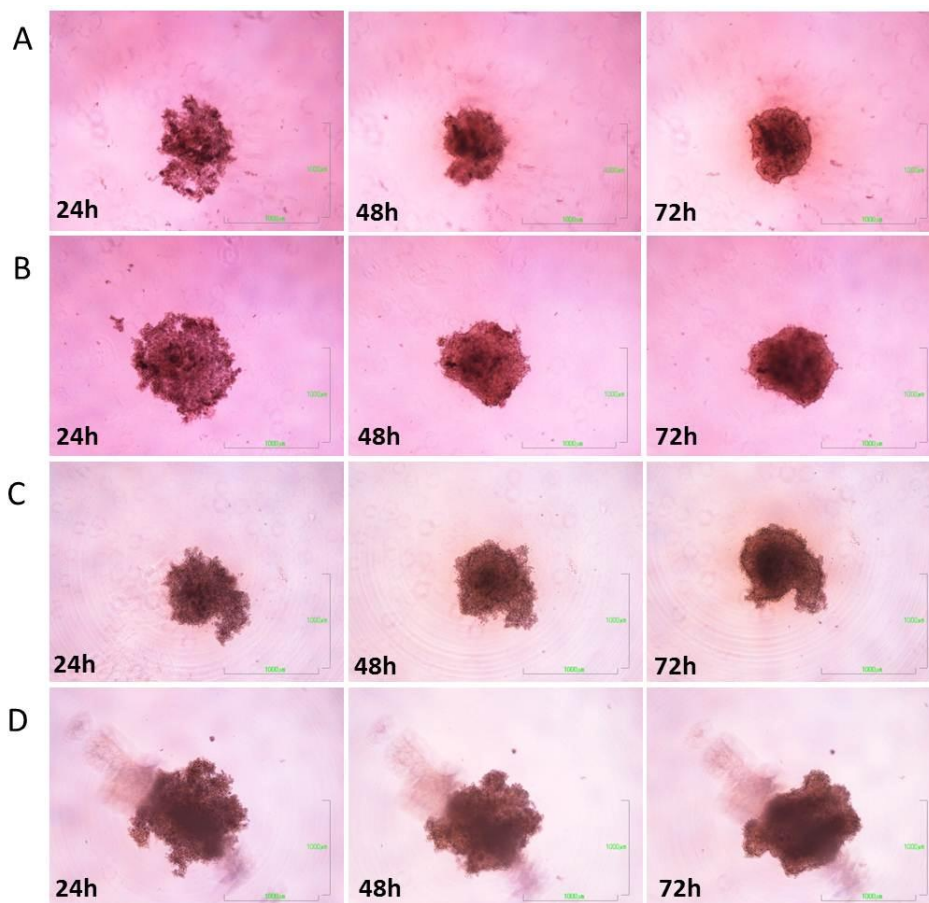


Fig. 1: Photomicrography of the process of formation of the spheroids on the Nunclon Sphera plate. Cell suspensions at densities of 5×10^3 cells A-375 and SKMEL-37 (A and C, respectively) and 1×10^4 cells A-375 and SKMEL-37 (B and D, respectively) were transferred into the 96 well plate and kept in a humid incubator with 5% CO₂ and 37°C. The formation process was observed through an inverted light microscope and the spheroids were photographed at 24h, 48h and 72h of incubation.

Figure 2 represents the growth process of the spheroids on the 4th, 6th and 7th day after the formation period. After the initial 72 hours of incubation for spheroid formation (time 0), 100 μ l of the culture medium was removed

and upon replenishing that volume, some cells dissociated and clustered around the spheroid. Nevertheless, it did not affect the growth of the spheroids and their size increased gradually until the end of the incubation period.

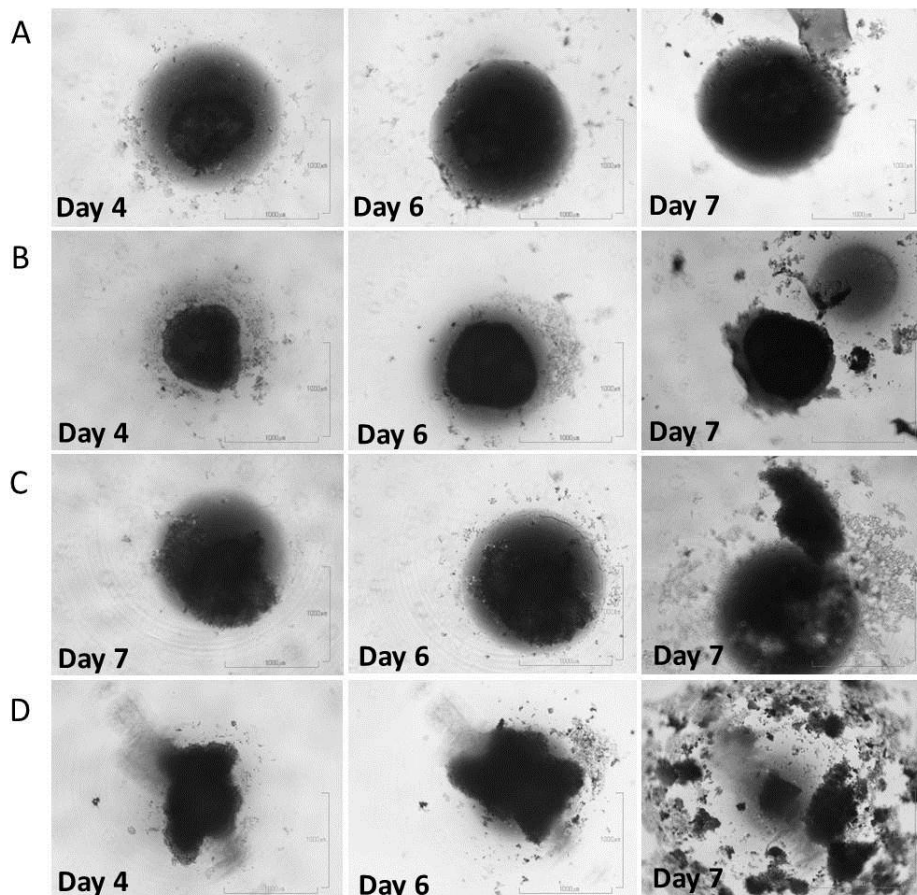


Fig. 2: Photomicrograph showing the spheroids incubated at 04, 06 and 07 days after the 72h period of their formation on the Nunclon Sphera plate. Spheroids formed with cell suspensions of A-375 at densities of 5×10^3 cells (A) and 1×10^4 cells (B). Spheroids formed with cell suspensions of SKMEL-37 at densities of 5×10^3 cells (C) and 1×10^4 cells (D). The spheroids were formed and maintained in a humid incubator at 37°C and 5% CO₂ for 10 days.

On the 7th day of incubation, the spheroid formed with cell suspensions at densities of 5×10^3 SKMEL-37 detached from the clustered cells that formed below it during replenishment of culture medium and the spheroid formed with cell suspensions at densities of 1×10^4 SKMEL-37 degraded.

3.2. Real-time qRT-PCR reactions

Results from the qRT-PCR reactions showed the expression of both ABCB1 and ABCB8 genes in the two cutaneous melanoma cell lines cultured at the initial density of 1×10^4 cells. Not enough material was obtained for analysis of the spheroids formed with 5×10^3 cells. The cDNA sample of the spheroids formed at time 0, after the initial incubation period of 72 hours, was used as reaction control.

The spheroids formed by the A-375 cells showed an increase in the level of expression of the ABCB1 gene at time 7 (07 days of incubation after its formation) when compared with the level of gene expression in spheroids at time 0 (control) and incubation time 4 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). There was no statistically significant differences between the spheroids at incubation time 0 and time 4 ($p = \text{NS}$) (Fig. 3a).

There was an increase in expression of the ABCB8 gene on the spheroids formed by the A-375 cells at time 7 compared with the spheroids at time 0 (control) and at time 04 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). The expression of the ABCB8 gene in the spheroids incubated for 04 days after formation were not significantly different from spheroids at time 0 ($p = \text{NS}$) (Fig. 3b).

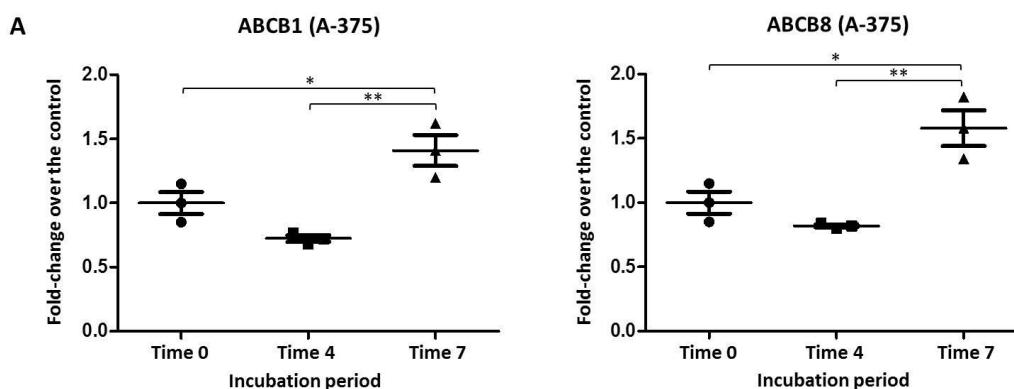


Fig. 3: Expression profile of the ABCB1 (A) and ABCB8 (B) genes in the spheroids of the melanoma line A-375. The average CT values of duplicates from each independent experiment was normalized by the expression of the GAPDH gene and the average of the spheroid CT values at time 0 (control). The graph shows the Fold-change values of the spheroids at time 4 and 7 compared with the control. The analysis of variance used was One Way ANOVA, followed by Tukey post-test. The difference was considered significant when $p \leq 0.05$.

For the spheroids formed by which SKMEL-37 cells, the ABCB1 gene was expressed in all incubation periods. However, there was no significant increase between the level of gene expression on the 4th day after its formation and the control (time 0) ($p = \text{NS}$). At incubation time 7, the spheroids formed by this cell line showed an increase in the level of expression of the ABCB1 gene in relation to incubation time 0 and 4 ($p < 0.01$) (Fig. 4a).

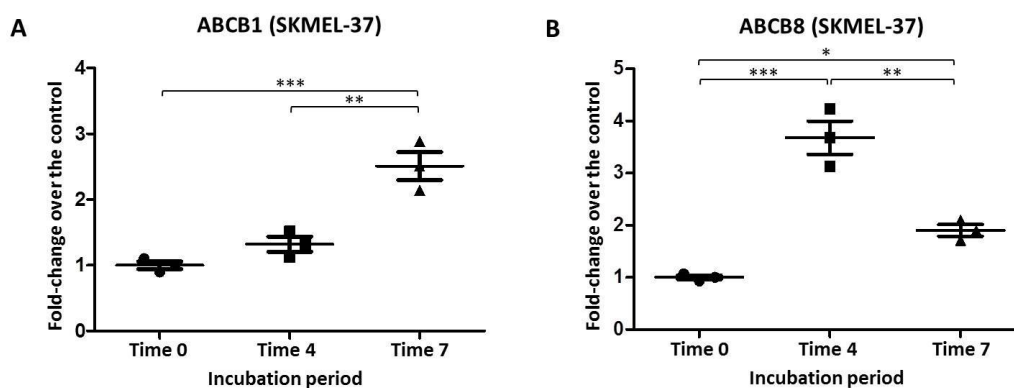


Fig. 4: Expression profile of the ABCB1 (A) and ABCB8 (B) genes in the spheroids of the melanoma line SKMEL-37. The average CT values of duplicates from each independent experiment was normalized by the expression of the GAPDH gene and the average of the spheroid CT values at time 0 (control). The graph shows the Fold-change values of the spheroids at time 4 and 7 compared with the control. The analysis of variance used was One Way ANOVA, followed by Tukey post-test. The difference was considered significant when $p \leq 0.05$.

The spheroids SKMEL-37 cells showed an increased level of expression of the ABCB8 gene on the 7th day of incubation after its formation when compared with the spheroid at time 0 ($p < 0.05$). At 4 days of incubation after spheroid formation, the spheroids of this cell line showed an increase in the level of expression of the ABCB8 gene in relation to the control ($p < 0.01$). In addition, there was observed a significant decrease in the expression level of ABCB8 gene ($p < 0.01$) between the incubation time 4 and 7 (Fig. 4b).

4. Discussion

Cutaneous melanoma is one of the most aggressive malignancies, representing a public health problem in many countries due to an increasing incidence over the last 30 years, estimated to double every 10-20 years [23]. Tumour resistance to chemotherapeutics is a major hindrance to the successful treatment of melanoma, being a key subject of research worldwide. It is essential to search for models that facilitate the comprehension of cellular behaviour and the tumour microenvironment to overcome chemoresistance.

Three-dimensional cell cultures facilitate the formation of multicellular spheroids and represent a method capable of better mimicking the tumour microenvironment *in vitro*. In this study, the formation of spheroids was accomplished through a microplate-based technique that used low cell attachment surface plates. Our results demonstrated that we were successful using the Nunclon Sphera plate, as it provided uniformly sized spheroids and allowed us to monitor the process of cell aggregation and spheroid growth. The U-bottom wells with minimal cell adherence surface were ideal for the formation of a single spheroid per well, providing consistency and reproducibility to the *in vitro* 3D tumour model system.

Using the cell lines A-375 and SKMEL-37 derived from cutaneous melanoma, we demonstrated the ability to control the size of spheroids based on the number of cells seeded into the microwells of the Nunclon Sphera plate. Furthermore, this technique resulted in the formation of spheroids after 72 hours of incubation, regardless of the density of cells seeded (5×10^3 or 1×10^4 cells/well). The design of this plate resulted in a high yield and efficiency in the formation and growth of the spheroids, making this method reproducible.

The structure of the spheroids provides a physiological context that mimics the tumour microenvironment, becoming an important tool in cancer research. For malignant melanoma, intrinsic drug resistance usually limits the success of chemotherapy. The correlation between the expression of ABC transporters in melanoma and MDR has been extensively investigated [8,10,24].

The ABCB1 gene is expressed in various tissues and has been extensively reported to confer resistance to a number of antitumor drugs in different human malignant tumours, including cutaneous melanoma [3]. In this study, the spheroids formed by the SKMEL-37 and A-375 cells presented an increase in the level of gene expression of the ABCB1 transporter on the 7th day of incubation after the formation period compared with the control.

The role of the ABCB1 gene in melanoma chemoresistance is controversial. As we observed the expression of the ABCB1 gene in the A-375 and SKMEL-37 strains, Heirmel et al. (2007) observed that most of the studied melanoma cell lines also expressed different levels of ABCB1 [10]. However, in other studies, such as that reported by Elliot and Al-Hajj (2009), the gene expression of ABCB1 is relatively low or absent in human melanoma cells [8].

The ABCB8 gene was expressed in all periods of incubation of the spheroids. However, an increase in the levels of gene expression of the ABCB8 transporter in the spheroids was detected only after 07 days of incubation in both cell lines studied. Similar results were reported by Schatton et al. (2008), who analyzed several ABC transporters in different cutaneous melanoma lines and observed that the ABCB8 gene was one of the ABC transporters most abundantly expressed in these cell lines [24]. Elliot and Al-Hajj (2009) also reported the expression of the ABCB8 gene in melanoma cells, where this transporter demonstrated specific role in mediating drug resistance in melanoma cells [8].

The concentration gradients of drugs, nutrients, gases and residues that characterize tumors *in vivo* are also recapitulated in spheroids. Since all these important factors influence the response to therapy [16], the 3D culture model of human melanoma, using low cell attachment surface plate, allows more through analysis of the temporal variations in the levels of differentially expressed genes associated with drug resistance. So future studies aiming at understanding the role of these transporters in mediation of specific drugs could be more realistically explored using spheroids.

References

1. Achilli TM, Meyer K, Morgan JR. (2012) Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* 12:1347-1360
2. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. (2010) From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010: 583748-583754
3. Basu R, Baumgaertel N, Wu S, Kopchick JJ. (2017) Growth hormone receptor knockdown sensitizes human melanoma cells to chemotherapy by attenuating expression of ABC drug efflux pumps. *Horm Cancer* 8:143-156
4. Beaumont KA, Mohana-Kumaran N, Haass NK. (2014) Modeling melanoma in vitro and in vivo. *Healthcare* 1:27-46
5. Chen KG, Valencia JC, Gillet JP, Hearing VJ, Gottesman MM. (2009) Involvement of ABC Transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 740-749
6. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hut T, Jiang L, Li J. (2016) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* 370: 153-164
7. Cekanova M, Rathore K. (2014) Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Des Devel Ther* 8:1911-1921
8. Elliot NT, Adamns J, Al-Hajj M. (2010) The ABCs of cancer stem cell drug resistance. *LDrugs* 13:632-635
9. Elliot NT, Yuan FA. (2011) A review of three-dimensional in vivo tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Scienc* 100: 59-74
10. Heimerl S, Bosserhoff AK, Langman T, Ecker J, Schmitz G. (2007) Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res* 17:265-273

11. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. (2018) Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *Int J Mol Sci* 18:181-205
12. Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. (2014) Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol* 5:159-182
13. Knigh E, Przyborski S. (2015) Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue like structures to be created in vitro. *J Anat* 227:746-756
14. Kuphal S, Haass NK. (2011) Cell-cell and cell-matrix contacts in melanoma and the tumor microenvironment. *Springer* 16:181-215
15. Laschke MW, Menger MD. (2017) Life is 3D: boosting spheroid function for tissue engineering. *Trends Biotech* 35:133-144
16. Lee JM, Mhawech-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA, Lawrenson K. (2013) A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest* 93:528-542
17. Levesque MP, Cheng PF, Raaijmakers ML, Saltari A, Dummer R. (2017) Metastatic melanoma moves on: translational science in the era of personalized medicine. *Cancer Metastasis Rev* 36:7-21
18. Lin RZ, Chang HY. (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotec J* 3:1172-1184
19. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:839-845
20. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. (2014) Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* 28: 1005-1011
21. Ross CL, Kaushik S, Valdes-Rodriguez R, Anvekar R. (2018) MicroRNAs in cutaneous melanoma: Role as diagnostic and prognostic biomarkers. *J Cell Physiol* 233: 5133-5141

22. Sadozai H, Gruber T, Hunger RE, Schenk M. (2017) Recent successes and future directions in immunotherapy of cutaneous melanoma. *Front Immunol* 8:1617-1625
23. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. (2014) Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life* 7:572-576
24. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. (2008) Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451:345-349
25. Shain AH, Bastian BC. (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16: 345-358
26. Singh BP, Salama AK. (2016) Updates in therapy for advanced melanoma. *Cancers* 15:17-32
27. Sun YL, Patel A, Kumar P, Chen ZS. (2012) Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chin J Cancer* 31:51-57
28. Xia CQ, Smith PG. (2012) Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol* 82:1008-1021

