

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



BIANCA MONTENEGRO DA CUNHA

PADRONIZAÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
HUMANAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO COMO UM MODELO
ALTERNATIVO *IN VITRO* PARA TRIAGEM DE TOXICIDADE

Duque de Caxias

2022

BIANCA MONTENEGRO DA CUNHA

PADRONIZAÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
HUMANAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO COMO UM MODELO
ALTERNATIVO *IN VITRO* PARA TRIAGEM DE TOXICIDADE

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Leandra Santos Baptista

Coorientador: Dr. Leonardo Boldrini

Duque de Caxias

2022

BIANCA MONTENEGRO DA CUNHA

PADRONIZAÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
HUMANAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO COMO UM MODELO
ALTERNATIVO *IN VITRO* PARA TRIAGEM DE TOXICIDADE

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Duque de Caxias, 16 de setembro de 2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

C972p Cunha, Bianca Montenegro da.

 Padronização de esferoides de células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo como um modelo alternativo *in vitro* para triagem de toxicidade / Bianca Montenegro da Cunha. – Duque de Caxias, 2022.

 94 f. : il. ; 30 cm.

 Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2022.
 “Orientadora: Prof.^a Dra. Leandra Santos Baptista

 Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Boldrini”.

 Referências: f. 70-91.

 1. Medicina. 2. Células-tronco. 3. Esferoides celulares. 4. Citotoxicidade celular. I. Baptista, Leandra Santos. II. Boldrini, Leonardo. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

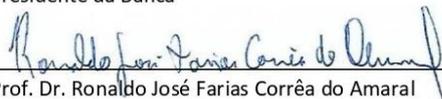
Às 09 horas, do dia 16 de setembro de 2022, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Dissertação versando sobre o projeto intitulado “Padronização de esferoides de células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo como um modelo alternativo in vitro para triagem de toxicidade”, de autoria de Bianca Montenegro da Cunha, aluna do Mestrado Acadêmico, sob orientação da Professora Leandra Santos Baptista e do Professor Leonardo da Cunha Boldrini Pereira. A sessão foi aberta pelo Prof. Celso Barbosa de Sant’Anna Filho, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Ronaldo José Farias Corrêa do Amaral e Prof^a. Fabiana Ávila Carneiro. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **satisfatórias**.

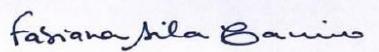
O presidente declarou a mestranda Bianca Montenegro da Cunha **aprovada**, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 CELSO BARBOSA DE SANT ANNA FILHO
Data: 16/09/2022 15:18:36-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Duque de Caxias, 16 de setembro de 2022.

Prof. Dr. Celso Barbosa Sant’Anna
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO
Presidente da Banca


Prof. Dr. Ronaldo José Farias Corrêa do Amaral
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ


Prof^a. Dr^a. Fabiana Ávila Carneiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ


Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional – BIOTRANS

COMISSÃO JULGADORA

Titulares

Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho (INMETRO)

Dr. Ronaldo José Farias Corrêa do Amaral (UFRJ)

Dra. Fabiana Ávila Carneiro (UFRJ)

Orientadora

Dra. Leandra Santos Baptista (UFRJ)

Co-orientador

Dr. Leonardo Boldrini (INMETRO)

Suplente

Dr. José Mauro Granjeiro (INMETRO)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Leandra Baptista, por desde a iniciação científica ter me concedido a oportunidade excepcional de integrar seu grupo de pesquisa (CTAB). Principalmente por ser sempre muito solícita a todos seus orientandos, disposta a resolver dúvidas, desde a bancada até o desenvolvimento teórico dos projetos. Agradeço por ser sempre um exemplo de profissionalismo.

Ao meu co-orientador, Leonardo Boldrini, por sempre se dedicar e acompanhar o desenvolvimento dos projetos de todos seus alunos, por sempre apoiar e incentivar as iniciativas e ideias.

A todos os membros do nosso grupo de pesquisa – Anderson, Beatriz Piassi, Isabelle Diederichs, Mellannie, Nicole, Renata Akemi, Taisnara, Tathiana, Valesca. E aos membros da GCell – Guilherme, Janaina, Juliana Barbosa e Juliana Curityba. Obrigada por todo auxílio nas rotinas do laboratório. Agradeço especialmente à minha aluna de iniciação científica, Isabelle Amorim, pela dedicação e disponibilidade em aprender e ajudar sempre que necessário.

À Rosangela, por toda a ajuda, desde a setagem de protocolos, uso de equipamentos, estatística, correção, dicas de apresentação...Enfim, esse projeto não seria o mesmo sem você! Muito obrigada.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite para participar da avaliação e revisão deste trabalho.

A todos os técnicos e alunos do Laboratório de Bioengenharia do INMETRO, em especial a Beatriz Kopke, Wanderson de Souza e Flavio Bezerra, pela ajuda com as nanopartículas e microscopia eletrônica.

Ao CBPF, pela doação da nCHA e pelo processamento e leitura da amostra.

À Danielle Rezende, inclusive por ter sido muitas vezes a única companhia no laboratório durante a pandemia.

Às minhas “roomies”, Lívia e Fran, pela amizade e pelas melhores receitas de todas as terças. Obrigada!

À minha professora de inglês e amiga, Guinnevere, pelas melhores correções e momentos. Thank you for everything!

Ao CNPq e FAPERJ (via Rede Nanosaúde) pelo auxílio financeiro e à Capes pela bolsa de pós-graduação.

À minha família por todo o apoio.

“A sabedoria é algo que quando nos bate à porta já não nos serve para nada.”

(Gabriel García Márquez)

RESUMO

A falta de translação de dados experimentais de ensaios com animais *in vivo* e sua desigualdade com a biologia humana motivam o desenvolvimento e a aplicação de sistemas de modelos derivados de células humanas. Este trabalho teve como objetivo comparar a aplicação de teste de citotoxicidade em modelos 2D e 3D utilizando células-tronco/estromais derivadas do tecido adiposo (ASC). Posteriormente, como o modelo 3D de triagem de toxicidade, objetivamos avaliar a citotoxicidade de uma nanopartícula, com aplicações em engenharia óssea. Com o aumento de lesões ósseas se tem buscado substitutos ósseos sintéticos e uma das principais abordagens visa associar biomateriais a células-tronco. Dentre os biomateriais cerâmicos mais prevalentes no tratamento ósseo encontra-se a hidroxiapatita (HA). Sua estrutura permite substituições que podem otimizar a cristalinidade, morfologia, biocompatibilidade e osteocondutividade, formando a hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (nCHA). Uma nova abordagem na engenharia de tecidos corresponde à utilização de esferoides de células-tronco como unidades modulares para fabricar tecidos biológicos *in vitro*, no entanto ainda há uma carência na adaptação de protocolos de citotoxicidade em modelos 3D de cultivo. Os resultados obtidos com as técnicas de vermelho neutro, quantificação de ATP e liberação de LDH no 2D demonstram que as ASCs são responsivas e compatíveis para triagem de toxicologia. No cultivo 3D, a quantificação de ATP foi adequada para analisar a toxicidade, ao contrário da liberação de LDH.

Palavras-chave: células-tronco/estromais mesenquimais, esferoides, toxicidade, modelos tridimensionais.

ABSTRACT

MONTENEGRO, Bianca. Standardization of human mesenchymal stem cell spheres derived from adipose tissue as an alternative *in vitro* model for toxicity screening. Duque de caxias, 2022. Dissertation (Master's degree in Translational Biomedicine) - Postgraduate Program in Translational Biomedicine, Unigranrio-Afya, Inmetro and UERJ, Duque de Caxias, 2022.

The lack of translation of experimental data from *in vivo* animal assays and its inequality with human biology motivate the development and application of model systems derived from human cells. This study aimed to compare the application of a cytotoxicity test in 2D and 3D models using adipose tissue-derived stem/stromal cells (ASC). Subsequently, as the 3D model of toxicity screening, we aimed to evaluate the cytotoxicity of a nanoparticle, with applications in bone engineering. With the increase in bone lesions, synthetic bone substitutes have been sought and one of the main approaches is to associate biomaterials with stem cells. Among the most prevalent ceramic biomaterials in bone treatment is hydroxyapatite (HA). Its structure allows substitutions that can optimize crystallinity, morphology, biocompatibility and osteoconductivity, forming nanostructured carbonated hydroxyapatite (nCHA). A new approach in tissue engineering corresponds to the use of stem cell spheroids as modular units to manufacture biological tissues *in vitro*, however there is still a lack of adaptation of cytotoxicity protocols in 3D culture models. The results obtained with the techniques of neutral red, ATP quantification and LDH release in 2D demonstrate that ASCs are responsive and compatible for toxicology screening. In 3D culture, ATP quantification was adequate to analyze toxicity, unlike LDH release.

Keywords: mesenchymal stem/stromal cells, spheroids, toxicity, three-dimensional models.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais.....	17
Figura 2	Aumento do número de publicações de culturas 3D.....	25
Figura 3	Processo de fabricação do micromolde de agarose.....	34
Figura 4	Análise de viabilidade celular da 3T3.....	42
Figura 5	Análise de viabilidade celular das ASC na cultura 2D.....	44
Figura 6	Liberação de LDH por concentração de SDS no cultivo 2D.....	46
Figura 7	Morfologia dos esferoides de 3T3 expostos a SDS.....	47
Figura 8	Análise de viabilidade celular dos esferoides de ASC expostos a SDS.....	49
Figura 9	Análise da liberação de LDH nos esferoides de ASC expostos a SDS.....	50
Figura 10	Viabilidade celular da monocamada de ASC exposta a nCHA.....	52
Figura 11	Comparação das análises de vermelho neutro e quantificação de ATP.....	53
Figura 12	Liberação de LDH em cultivo 2D de ASC exposto a SDS versus nCHA.....	54
Figura 13	Etapas de preparo da agarose micromoldada em 3D Petri Dish®.....	55
Figura 14	Medição de tamanho dos esferoides de ASC expostos a nCHA.....	56
Figura 15	Comparação da liberação de LDH dos esferoides de ASC expostos a SDS ou nCHA.....	57
Figura 16	Microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides expostos a nCHA.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Potenciais de diferenciação e aplicação das MSCs.....	18
Tabela 2	Exemplos de ensaios clínicos com células-tronco mesenquimais.....	19
Tabela 3	Comparação de métodos de cultura de células 2D e 3D.....	22
Tabela 4	Densidades celulares utilizadas em cada tipo celular.....	33
Tabela 5	Componentes do meio de cultivo 3D com as respectivas concentrações..	34
Tabela 6	Concentrações de nCHA testadas no 2D e 3D.....	35
Tabela 7	Concentrações de SDS usadas no 2D e 3D.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ASC	Adipose derived stem/stromal cells, células-tronco/estromais derivadas de tecido adiposo
bmMSCs	Bone marrow mesenchymal stem/stromal cells, célulastronco/estromais mesenquimais isoladas da medula óssea
CD	Cluster of differentiation, cluster de diferenciação
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low glucose, meio de Eagle modificado por dulbecco-baixa glicose e por alta glicose
DMSO	Dimetilsulfóxido de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IC50	Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular
HA	Hidroxiapatita
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
nCHA	Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada
PBS	Salina de fosfato tamponada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SMSCs	Synovial Mesenchymal Stem Cells, células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial
TNF- α	Tumor necrosis fator- alpha, Fator de necrose tumoral - alfa
ucb-MSCs	Umbilical cord blood- Mesenchymal Stem Cells, células-tronco mesenquimais do cordão umbilical

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Contextualização.....	14
1.2	Células-tronco mesenquimais.....	16
1.3	Células-tronco/estromais derivadas do tecido adiposo.....	19
1.4	Modelos bidimensionais e tridimensionais de cultivo celular.....	20
1.4.1	Modelos 2D.....	20
1.4.2	Modelos 3D.....	22
1.5	Adaptação de modelos 3D para toxicidade.....	25
1.5.1	Testes toxicológicos em modelos 2D x 3D.....	25
1.6	Abordagens da Bioengenharia para regeneração.....	28
1.6.1	Associação de células-tronco a biomateriais.....	28
2	OBJETIVO.....	30
2.1	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Isolamento e expansão das células em monocamada.....	31
3.2	Cultivo bidimensional em placa de 96 poços.....	32
3.3	Fabricação do hidrogel de agarose micromoldado.....	33
3.4	Cultivo tridimensional em hidrogel de agarose micromoldado.....	34
3.5	Fabricação dos esferoides associados a nCHA.....	35
3.6	Medição do diâmetro dos esferoides.....	35
3.7	Exposição da monocamada de ASC ao SDS.....	36
3.8	Exposição dos esferoides ao SDS.....	37
3.9	Viabilidade celular 2D – Captação De Vermelho Neutro (NRU).....	37
3.10	Citotoxicidade celular – LDH.....	39
3.11	Microscopia eletrônica de transmissão.....	39
3.12	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Ensaio 2D.....	41
4.1.1	SDS.....	41
4.1.1.1	Ensaio de captação de vermelho neutro - Balb/C Balb /3t3 A1 A1.....	41
4.1.1.2	ASC é um modelo celular adequado para captação de vermelho neutro em ensaios citotóxicos.....	42

4.1.1.3	SDS aumenta a liberação de LDH em cultivo de ASC.....	45
4.2	Ensaio 3D.....	46
4.2.1	SDS.....	46
4.2.1.1	Observação da viabilidade celular dos esferoides de Balb /3t3 A1 diante da exposição ao SDS.....	46
4.2.1.2	Avaliação da viabilidade celular dos esferoides de ASC por exposição ao SDS.....	47
4.2.1.3	Aumento na liberação de LDH das ASCS frente ao tratamento com SDS.....	50
4.3	Ensaio 2D.....	51
4.3.1	Nanopartícula – nCHA.....	51
4.3.1.1	Nanopartícula nCHA não apresentou efeito citotóxico em monocamada.....	51
4.3.1.2	O Kit comercial foi comparável ao ensaio certificado em monocamada.....	53
4.3.1.3A	nCHA apresentou baixa liberação de LDH.....	53
4.4	Ensaio 3D.....	54
4.4.1	nCHA.....	54
4.4.1.1	A nCHA não afetou a formação dos esferoides.....	54
4.4.1.2	A nCHA em esferoides gerou baixa liberação de LDH.....	57
4.4.1.3	A análise ultraestrutural dos esferoides sugere que a nCHA está internalizada.....	57
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÃO.....	66
7	REFERÊNCIAS.....	67
8	ANEXO I.....	90

1 Introdução

1.1 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco/estromais mesenquimais (MSCs, do inglês *Mesenchymal stem cells*) constituem uma população de células estromais, similares aos pericitos, presentes na medula óssea e na maioria dos tecidos conjuntivos, como tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), sangue periférico (CHONG *et al.*, 2012), parede do cordão umbilical (ROMANOV *et al.*, 2003), fluido amniótico e placenta (IN'T ANKER *et al.*, 2003).

Essas células apresentam funções na manutenção e reparo de diversos tecidos do organismo. São células indiferenciadas e multipotentes com potencial de se diferenciarem em vários tecidos da linhagem mesodermal (Figura 1), como os tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (KIM E PARK, 2017; POURRAJAB *et al.*, 2013; NCHARBORD *et al.*, 2010; PITTENGER *et al.*, 1999).

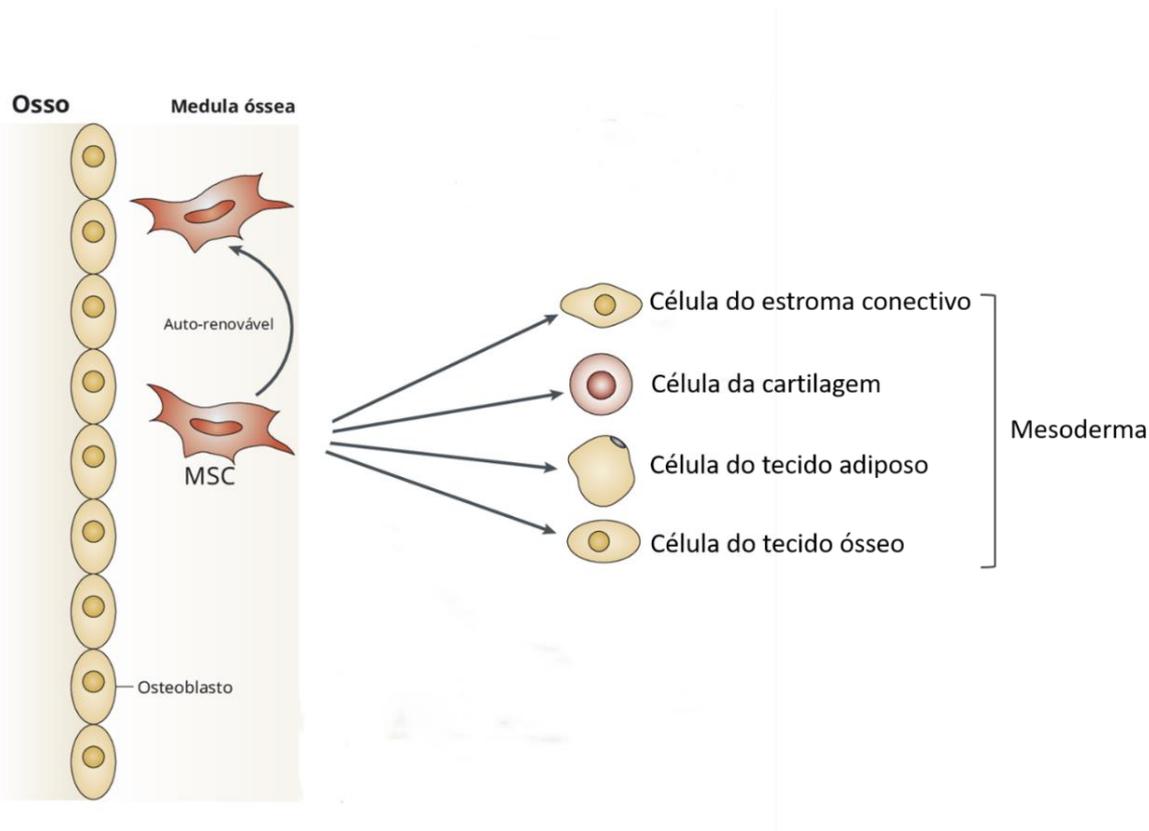


Figura 1. Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais. As células-tronco mesenquimais são ditas multipotentes, uma vez que possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em células da linhagem mesodermal, tais como células do estroma do conectivo, do

tecido cartilaginoso, do tecido adiposo e do tecido ósseo. MSC, células-tronco mesenquimais (Adaptado de UCCELLI, MORETTA E PISTOIA, 2008).

Há um número crescente de publicações abordando a heterogeneidade das MSCs (ANDRZEJEWSKA *et al.*, 2019). A dissemelhança dos potenciais de diferenciação ocorre devido às diferenças no transcriptoma, proteoma, imunofenótipo e atividades imunomoduladoras de vários tipos de MSCs. Dessa forma, a fonte da qual as células são isoladas implicam em tendências distintas de diferenciação celular.

MSCs derivadas da medula óssea (bmMSCs, do inglês, *bone marrow mesenchymal stem Cells*) exibem capacidade superior para diferenciação em osteogênese e condrogênese sob protocolos de diferenciação (LIN *et al.*, 2019); células-tronco mesenquimais derivadas de líquido e membrana sinoviais (sMSCs, do inglês *synovial mesenchymal stem Cells*) exibem proliferação e potencial condrogênico mais significativo do que as MSCs derivadas de tecido adiposo (ASCs, do inglês *adipose derived stem/stromal cells*) (MOCHIZUKI *et al.*, 2006). Já as MSCs derivadas do sangue do cordão umbilical (ucb-MSCs, do inglês *umbilical cord blood-mesenchymal stem cells*) mostram vantagens em relação a outras fontes adultas, uma vez que podem ser cultivadas por períodos maiores de cultivo, serem expandidas em maior escala, demoram mais para entrarem em senescência e ainda possuem efeitos anti-inflamatórios superiores (JIN *et al.*, 2013).

As ASCs constituem as fontes mais utilizadas para o isolamento de MSCs uma vez que esse processo é considerado minimamente invasivo e a densidade celular isolada é elevada (BAPTISTA *et al.*, 2017). Assim, a escolha da fonte deve ser pautada na finalidade específica. A tabela 1 resume os potenciais de diferenciação e aplicação das MSCs.

Tabela 1. Potenciais de diferenciação e aplicação das MSCs.

Diferenciação	Fontes	Indutores	Métodos de identificação	Aplicação	Referências
Osteoblasto	BMSCs e ASCs	β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona	Colorações: Vermelho de Alizarina e Von Kossa IHQ: Colágeno tipo I, osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN) Atividade de Fosfatase alcalina (ALP), medição de cálcio	Regeneração óssea	(CHOUDHERY <i>et al.</i> , 2013)
Condrócito	BMSCs e ASCs	ácido ascórbico, dexametasona, TGF- β 1/TGF- β 3	Colorações: Alcian-Blue e azul de toluidina IHQ: Colágeno tipo II e X, SOX (9, 5, 6), Agrecano, NOX 4, Condroitina 4-sulfotransferase	Regeneração da cartilagem	(PARK <i>et al.</i> , 2011) (PIEVANI <i>et al.</i> , 2014)
Neurócitos	BMSCs e ASCs	EGF, HGF, VEGF, BHA, KCl, forskolina, ácido valpróico, insulina e hidrocortisona	IHQ: Enolase, Tubulina- β III, GFAP, S100, MBP, MAP2, NF	Regeneração do nervo	(CHUNG <i>et al.</i> , 2013) (BAE <i>et al.</i> , 2011) (HOU <i>et al.</i> , 2003)
Cardiomiócitos	ASCs	bFGF e 5-azacitidina	Desmina, M-caderina, MHC, α -actina cardíaca, cTnl	Regeneração miocárdica	(LEI <i>et al.</i> , 2012) (XU <i>et al.</i> , 2004)

Fonte: Adaptado de (HAN *et al.*, 2019).

Dentre as principais vantagens das MSCs na medicina regenerativa destaca-se: a alta disponibilidade de fontes teciduais para o isolamento celular; a imunomodulação; a angiogênese; as atividades antiapoptótica, antifibrótica e quimioatrativa; os efeitos parácrinos e ausência de entraves éticos em relação à sua

aplicação (SAEEDI *et al.*, 2019; KIM E PARK, 2017; PATEL *et al.*, 2013; JONES *et al.*, 2007; NCHANG *et al.*, 2006).

Sob uma injúria tecidual, as MSCs migram para o sítio inflamatório, exercendo atividades imunomodulatórias ao inibir a atividade de células do sistema imune e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor- alpha*) e interferon gama (IFN- γ), atuando então no reparo tissular (WANG *et al.*, 2014). A tabela 2 traz alguns ensaios clínicos empregando as MSCs.

Tabela 2. Exemplos de ensaios clínicos com células-tronco mesenquimais.

Ensaio clínico	Ano e identificador	Status	Informações	Referência
Amnion bilayer and stem cell combination therapy on thin endometrium infertile patients	2020- NCT04676269	Fase I	Células epiteliais do âmnio para pacientes inférteis	www.clinicaltrials.gov
A phase I/IIa, open label, dose-escalating clinical study to evaluate the therapeutic effects of astrocytes derived from human embryonic stem cells, in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)	2018- NCT03482050	Fase II	Injeção intratecal em pacientes com esclerose lateral amiotrófica	www.clinicaltrials.gov
Long term follow up phase I/II, open, multi-center, prospective study using human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelial for patients with age-related macular degeneration (AMD)	2015- NCT02463344	Completo	Sem sinais de hiperproliferação, tumorigenicidade, formação de tecido ectópico ou rejeição aparente após 4 meses	www.clinicaltrials.gov
Safety and efficacy Phase I study of Umbilical Cord/Placenta-(UC) derived MSCs to treat Ankylosing Spondylitis (AS)	2011- NCT01420432	Completo	Associação de MSCs e medicamentos antirreumáticos como anti-inflamatórios e imunomoduladores	www.clinicaltrials.gov

Fonte: Adaptado de (VASANTHAN *et al.*, 2020).

1.2 Células-tronco/estromais derivadas do tecido adiposo

O tecido adiposo subcutâneo constitui uma das fontes mais utilizadas para isolamento de mesenquimais (MSCs) (KIM e PARK, 2017). As MSCs isoladas desse tecido são morfológica e fenotipicamente similares às MSCs isoladas da medula óssea, no entanto, são consideradas uma nova população celular por pertencerem a microambientes tissulares distintos além de apresentam origens diferentes (BOURIN *et al.*, 2013 e BAPTISTA *et al.*, 2007).

As ASCs são definidas como células-tronco mesenquimais por seguirem os critérios estipulados pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT, do inglês *International Society for Cellular Therapy*). Os critérios são: (A) aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultivo *in vitro* 2D, (B) potencial de diferenciação nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica, (C) expressão de marcadores de superfície estromais incluindo CD73, CD90 e CD105 (DOMINICI *et al.*, 2006). Quando isoladas, durante os primeiros ciclos de proliferação, as ASCs apresentam marcadores celulares como CD90, CD105, CD73, CD44, CD166 e CD34, e expressão negativa do marcador hematopoiético CD45, (BAPTISTA *et al.*, 2009).

Uma das principais vantagens da utilização de ASCs em protocolos de medicina regenerativa deve-se a sua capacidade de imunomodulação e secreção de fatores parácrinos. Os efeitos terapêuticos promovidos pelas ASCs ocorrem mediante citocinas e mediadores solúveis secretados e não por eventos de diferenciação em si (BOBYLEVA *et al.*, 2019). Quando mantidas *in vitro*, as ASCs mantêm sua capacidade de interagir e regular a função de células efectoras envolvidas nos processos de resposta imune primária e adquirida.

1.3 Modelos bidimensionais e tridimensionais de cultivo celular

1.3.1 Modelos 2D

A cultura de células bidimensional (2D) tem sido o método usado para cultivar células desde o início do século XX (FERREIRA *et al.*, 2018), e atualmente constitui a principal ferramenta empregada em experimentos *in vitro*, desde pesquisas fundamentais até aplicadas, em particular, no desenvolvimento de métodos de terapia

antitumoral usando cultivos híbridos e nanopartículas carregadas com substâncias bioativas (SHIPUNOVA *et al.*, 2021; SHRAMOVA *et al.*, 2020; ZELEPUKIN *et al.*, 2021), mas tem muitas limitações pois representam o tecido de forma imprecisa (COSTA *et al.*, 2016).

Em culturas 2D aderentes, as células crescem como uma monocamada em um frasco de cultura ou em uma placa de Petri plana, aderidas à uma superfície plástica (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). As vantagens das culturas 2D estão associadas à manutenção simples e de baixo custo da cultura celular, em relação ao cultivo 3D, e à realização de testes funcionais, já adaptados para esse cultivo.

Todavia, em termos de biologia celular, as culturas aderentes possuem algumas desvantagens. Neste método de cultura, as interações célula-célula e célula-matriz extracelular não são representadas fidedignamente como *in vivo*. Essas interações são responsáveis pela diferenciação celular, proliferação, viabilidade, expressão de genes e proteínas, responsividade a estímulos, metabolismo de drogas e outras funções celulares (BAKER *et al.*, 2012; PAMPALONI *et al.*, 2007; BISSELL *et al.*, 2003).

Após o isolamento do tecido e a transferência para as condições 2D, a morfologia das células é alterada, assim como o modo de divisão celular e há perda de diversos fenótipos (PETERSEN *et al.*, 1992; MARK *et al.*, 1977). A morfologia alterada das células pode afetar a função (CABALLERO *et al.*, 2015; KILIAN *et al.*, 2010); a organização de estruturas no interior das células e a secreção e sinalização celular (NELSON *et al.*, 2006; DEBNATH *et al.*, 2005).

Devido a esses distúrbios nas interações com o meio externo, as células que crescem aderentes perdem sua polaridade (MSEKA *et al.*, 2007), o que altera a resposta a fenômenos, como a apoptose (MEYERS *et al.*, 2006; WEAVER *et al.*, 2002). Outra questão é que as células da monocamada têm acesso ilimitado aos componentes do meio, oxigênio, nutrientes, metabólitos e moléculas sinalizadoras. Para células *in vivo*, a disponibilidade de nutrientes e oxigênio ocorre de maneira variável devido à arquitetura tridimensional. Observou-se também que o sistema 2D altera a expressão gênica e *splicing*, topologia e bioquímica da célula (LI *et al.* 2006; BIRGERSDOTTER *et al.*, 2005; FUCHS *et al.*, 2004).

Ademais, as culturas aderentes geralmente são monoculturas e permitem o estudo de apenas um tipo de célula (FISCHBACH., 2007), o que resulta na falta de

microambientes ou nichos. Essas interações célula-célula e célula-matriz consideravelmente reduzidas limita significativamente sua capacidade de recapitular o nível apropriado de respostas celulares *in vivo*.

Baseado nessas desvantagens dos sistemas 2D, houve a necessidade de encontrar modelos alternativos, mais capazes de mimetizar o ambiente *in vivo*, como sistemas de cultura 3D. A tabela 3 resume as características de cada cultivo.

Tabela 3. Comparação de métodos de cultura de células 2D e 3D.

Tipo de cultivo	2D	3D	Referências
Interações celulares	Privado de interações célula-célula e célula-ambiente extracelular, sem microambientes semelhantes ao <i>in vivo</i> e sem “nichos”	Interações adequadas célula-célula e célula-ambiente extracelular	(CAWKILL <i>et al.</i> , 2007) (LEE <i>et al.</i> , 2008)
Características celulares	Morfologia e divisões alteradas; perda de fenótipos e polaridade; proliferação mais rápida que <i>in vivo</i>	Preservação da morfologia, modo de divisões, fenótipo e polaridade	(HUANG <i>et al.</i> , 2013) (BAKER <i>et al.</i> , 2012)
Exposição ao meio/substâncias	Acesso ilimitado e igual a oxigênio, nutrientes, metabólitos e moléculas de sinalização em contraste ao <i>in vivo</i>	Acesso variável a oxigênio, nutrientes, metabólitos e moléculas de sinalização, mais compatível ao <i>in vivo</i>	(BRESLIN <i>et al.</i> , 2013) (TREDAN <i>et al.</i> , 2007)
Fase do ciclo celular	Mais células no mesmo estágio do ciclo celular devido à exposição igual ao meio	Esferoides contêm células proliferativas, quiescentes, hipóxicas e necróticas	(TIBBIT <i>et al.</i> , 2009) (TREDAN <i>et al.</i> , 2007)
Sensibilidade à medicamentos	Células menos resistentes aos medicamentos, devido à má metabolização, aparentando mais citotoxicidade	Células mais resistentes aos medicamentos, com representação mais precisa dos efeitos <i>in vivo</i>	(LANGHANS, 2018) (HAISLER <i>et al.</i> , 2013)
Junção celular	Representação menos precisa das junções <i>in vivo</i>	Junções mais precisas e permitem comunicação célula-célula através de trocas de íons, pequenas moléculas e correntes elétricas	(LANGHANS, 2018) (LANG <i>et al.</i> , 2019)
Resposta à estímulos	Representação imprecisa da resposta à estímulos mecânicos pois as células não experimentam ação da gravidade por serem incapazes de se expandir para a terceira dimensão	Representação mais precisa dos estímulos mecânicos por terem três dimensões	(RAVI <i>et al.</i> , 2014) (COSTA <i>et al.</i> , 2016)

Mecanismos celulares	Alterações na expressão gênica, topologia e bioquímica celular	Expressão gênica, topologia e bioquímica celular mais semelhante ao <i>in vivo</i>	(LI et al., 2006)
Custo de manutenção	Custos menores em relação ao 3D	Testes mais custosos e menos disponíveis comercialmente, porém reduz as diferenças entre as triagens de fármacos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> reduzindo o uso de animais	(WEISWALD et al., 2015) (SODUNKE et al., 2007)
Uso e análise	Altamente replicável e facilmente interpretável, sendo melhor para culturas de longo prazo	Pode ser difícil replicar experimentos e interpretar dados	(KAPAŁCZYŃSKA et al., 2016)

Fonte: Adaptado de (JENSEN; TENG, 2020; KAPAŁCZYŃSKA et al., 2016).

1.3.2 Modelos 3D

A cultura de células 3D mostrou melhorias em relação ao cultivo 2D em estudos direcionados à morfologia, monitoramento do número de células, proliferação, resposta a estímulos, diferenciação, metabolismo de drogas e síntese de proteínas (ANTONI et al., 2015). Isso é proporcionado pela capacidade dessas culturas de modelar uma célula *in vivo* enquanto é cultivada *in vitro* (RAVI et al., 2015). A cultura de células 3D tem muitas aplicações, tais como pesquisa do câncer (POORNIMA et al., 2022), pesquisa de células-tronco (YLOSTALO, 2020), desenvolvimento de medicamentos (FANG; EGFLEN, 2017) e testes toxicológicos (WANG et al., 2021).

Dentre as técnicas disponíveis, existem as baseadas em *scaffold*, como à base de hidrogel; à base de material polimérico; fibra de vidro hidrofílica, esferoides e organoides. Os hidrogéis possuem capacidade de imitar a matriz extracelular (MEC), permitindo que fatores solúveis, como citocinas e fatores de crescimento, trafeguem através do gel semelhante ao que ocorre no tecido (LANGHANS, 2018). Os hidrogéis são versáteis, podendo ser aplicados para criar esferoides.

Existem hidrogéis naturais e sintéticos, sendo os géis naturais comumente feitos com polímeros naturais, como fibrinogênio, ácido hialurônico, colágeno, Matrigel, gelatina, quitosana e alginato (DHALIWAL, 2012). Géis naturais feitos de colágeno

têm sido empregados para modelar tumores 3D, em que as células foram incorporadas ao gel e o modelo 3D permitiu a triagem de drogas, bem como demonstrou diferenças na morfologia das células, densidade e sensibilidade às drogas quando comparadas às células cultivadas em monocamada (VAN-MINH *et al.*, 2016).

Os hidrogéis sintéticos são tipicamente sintetizados de polímeros produzidos a partir de polietilenoglicol (PEG), ácido polilático (PLA) ou poli(acetato de vinil) (PVA) (DHALIWAL, 2012). Um estudo mostrou que as células hepáticas HepG2 cultivadas usando um scaffold polimérico 3D foram menos afetadas por compostos citotóxicos e tiveram maior viabilidade do que aquelas cultivadas em 2D (VAN-MINH *et al.*, 2016).

Os organoides e esferoides são capazes de formar fibras de MEC que unem células individuais mediante integrinas e replicam o microambiente dos órgãos permitindo a modelagem de doenças por meio do uso de células-tronco (YIN *et al.*, 2016).

As técnicas livres de arcabouço, *scaffold-free*, produzem tecidos através da mimetização de processos do desenvolvimento embrionário, formando um microambiente mais semelhante ao encontrado *in vivo*. Tais processos seguem etapas de condensação celular, proliferação, diferenciação, produção de matriz extracelular e maturação tissular. Nessas abordagens livres de arcabouço ocorre o processo de automontagem ou *self-assembly*, no qual não há forças externas orquestrando a formação de estruturas 3D, como os esferoides (THOMAS *et al.*, 2016; DU RAINE *et al.*, 2015).

As técnicas disponíveis atualmente para produção de esferoides incluem microplacas suspensas, levitação magnética e esferoides formados em hidrogéis de baixa aderência, como a agarose.

As placas suspensas permitem a formação de esferoides por autoagregação/automontagem através do uso da gravidade. Os esferoides ficam pendurados em poços sem fundo abertos. Os métodos de placa suspensa têm uma ampla gama de usos devido à sua replicabilidade. Foi realizado um estudo no qual esferoides cardíacos foram desenvolvidos por co-cultura de células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas, cujos resultados mostraram um modelo de cultura de células no qual os efeitos tóxicos

no tecido cardíaco humano podem ser estudados devido à semelhança aos esferoides cardíacos (LANGHANS, 2018).

A levitação magnética é realizada injetando células com nanopartículas magnéticas, permitindo que as células se agreguem em um esferoide quando expostas a um campo magnético externo (ímã). Isso cria um ambiente celular concentrado no qual a MEC pode ser sintetizada, e a análise via Western blotting e outros ensaios bioquímicos podem ser realizados (HAISLER *et al.*, 2015). Além disso, o ímã externo pode ser usado para manipular a cultura 3D, permitindo um controle da arquitetura e localização espacial das células.

Microplacas de esferoides com revestimento de fixação ultrabaixa são comumente usadas para estudar células tumorais, bem como para culturas multicelulares devido a produção que pode ser em larga escala (IMAMURA *et al.*, 2015). Estudos mostram que esferoides multicelulares apresentam características de crescimento muito diferentes quando comparadas às culturas de células 2D. As células em 3D exibiram resistência a múltiplas drogas, características semelhantes a células-tronco e a motilidade celular foi aumentada (IMAMURA *et al.*, 2015).

A cultura de esferoides é uma tecnologia amplamente utilizada e vem sendo desenvolvida há quase três décadas (LANDRY *et al.*, 1985). Os esferoides podem criar populações de células heterogêneas, como células hipóxicas *versus* normóxicas, quiescentes *versus* células replicantes, com gradientes de oxigênio, nutrientes, metabólitos e sinais solúveis. Além disso, os esferoides têm uma geometria bem definida e interações fisiológicas célula-célula e célula-matriz extracelular (EDMONDSON *et al.*, 2014).

Uma ferramenta ainda muito utilizada na pesquisa é o uso de modelos animais, majoritariamente para testar novos medicamentos e estratégias de tratamento. As técnicas de cultura 3D permitem modelar tumores e órgãos para realizar testes de tratamentos medicamentosos neles. Especialistas sugerem que, à medida que esses modelos continuarem a serem aperfeiçoados e se tornarem mais comuns, menos modelos animais precisarão ser usados. A figura 2 a seguir mostra o aumento do número de publicações em culturas de células 3D.

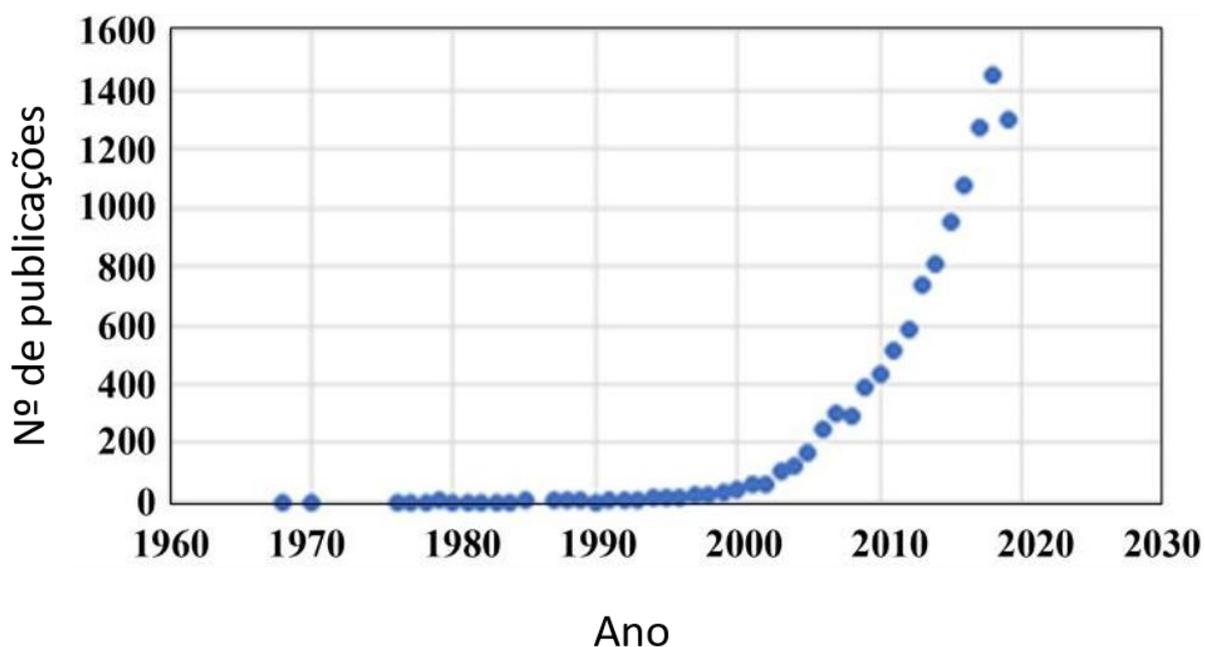


Figura 2. Número de publicações de cultivo 3D por ano. Observa-se o aumento do número de publicações de culturas 3D. Publicações por ano (1968–2020), coletadas no PubMed. Fonte: Adaptado de (JENSEN; TENG, 2020).

1.4 Adaptação de modelos 3D para toxicidade

1.4.1 Testes toxicológicos em modelos 2D x 3D

A descoberta de medicamentos é o aspecto mais importante nos campos da medicina e farmacologia, no entanto, é recorrente que apesar de demandar muito tempo e investimentos, produz baixas taxas de sucesso ao testar novos medicamentos em modelos animais, em ensaios pré-clínicos (LANGHANS, 2018).

Devido à essas discrepâncias, menos da metade de todos os medicamentos em ensaios clínicos de Fase II e III são bem-sucedidos, indicando a necessidade imediata de novos métodos e tecnologias que melhorem a eficácia da descoberta de medicamentos (LANGHANS, 2018).

Os modelos animais tendem a ser custosos, enquanto os ensaios com células cultivadas provaram ser facilmente replicáveis, rápidos e econômicos (COSTA *et al.*, 2016). O método mais comumente usados na descoberta de drogas até o momento

se baseia no uso de culturas de células 2D (COSTA *et al.*, 2016). O cultivo 2D proporcionou muitos avanços na descoberta de processos biológicos e de doenças, mas são incapazes de reproduzir a complexa experiência das células no microambiente tecidual (COSTA *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2017).

A descoberta de medicamentos depende da compreensão da relação entre as células e a MEC ao qual elas interagem (CUSHING e ANSETH, 2007). As moléculas da MEC incluem proteínas de matriz, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fatores de crescimento, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), bem como outras proteínas secretadas (BRESLIN e O'DRISCOLL, 2013). Esses fatores de crescimento e proteínas desempenham papéis fundamentais na regulação da proliferação, migração, diferenciação, adesão e sobrevivência celular (BONNANS *et al.*, 2014). Além disso, a estrutura da MEC pode afetar a resposta da célula aos medicamentos, alterando o mecanismo de ação de um medicamento, amplificando a eficácia do medicamento ou aumentando a afinidade das células pela resistência aos medicamentos (BONNANS *et al.*, 2014).

Para prever a eficácia de um medicamento em uma célula, um modelo de cultura 3D teria que mimetizar o microambiente do tecido no qual as células podem proliferar, agregar e diferenciar (LV *et al.*, 2017). A descoberta de medicamentos depende da compreensão da ligação entre as células e a MEC na qual elas interagem (CUSHING e ANSETH, 2007). A estrutura da MEC pode afetar a resposta celular aos medicamentos, alterando o mecanismo de ação deles, amplificando a eficácia do medicamento ou aumentando a afinidade das células aos medicamentos (BONNANS *et al.*, 2014). Dessa forma, as células cultivadas em 3D podem apresentar respostas diferentes aos medicamentos do que as células cultivadas em 2D por inúmeras razões.

Primeiro, as diferenças nas propriedades físicas e fisiológicas entre culturas 2D e 3D fazem com que as células em 2D sejam mais suscetíveis aos efeitos dos medicamentos pois são incapazes de manter uma morfologia normal (CUSHING e ANSETH, 2007; LV *et al.*, 2017; LANGHANS, 2018).

Segundo, no cultivo 2D, os receptores de superfície celular, que são alvos dos fármacos, apresentam uma organização estrutural e espacial diferente, afetando a eficácia da ligação dos fármacos aos receptores, culminando em respostas

discrepantes (CUSHING e ANSETH, 2007; BONNANS *et al.*, 2014; LV *et al.*, 2017; LANGHANS, 2018; LANCASTER e KNOBLICH, 2014).

Terceiro, as células cultivadas em 2D geralmente estão todas no mesmo estágio celular, enquanto as células 3D geralmente estão em diferentes estágios celulares, semelhante ao que ocorre nas células *in vivo* (LANGHANS, 2018). Em células 3D, a diferença no estágio celular provavelmente significa que existem células em proliferação disponíveis na região externa da célula (BONNANS *et al.*, 2014) e muitos medicamentos exigem que a proliferação celular seja eficaz, favorecendo a cultura de células 3D (LANGHANS, 2018).

Por fim, a diferença de morfologia entre células 2D e 3D causa uma diferença nos níveis de pH locais dentro das células, pois as de células 3D têm maior profundidade e níveis mais baixos de pH intracelular causam redução na eficácia do medicamento, contribuindo para a resistência ao medicamento (LANCASTER e KNOBLICH, 2014).

O perfil metabólico é usado para demonstrar a cooperação metabólica entre vários tipos de células e está se tornando uma técnica popular em modelos de cultura 3D devido à precisão dos resultados quando comparados às células *in vivo* (TUNG *et al.*, 2011). Anteriormente, os modelos de cultura 2D eram usados para testar o metabolismo do câncer, mas estudos recentes sugerem que os modelos de cultura 3D fornecem mais informações ao testar a eficácia de novos medicamentos (RUSSELL *et al.*, 2017).

Por meio desses perfis, constataram que os tratamentos com medicamentos às vezes matam todas as células na monocamada de cultura 2D, mas apenas algumas das células que compõem a camada protetora de esferoides em modelos 3D (RUSSELL *et al.*, 2017). A dimensão extra na cultura 3D auxiliou na compreensão das falhas presentes nos modelos 2D que causam taxas mais baixas de eficácia do medicamento em relação aos ensaios *in vivo* (FERRICK *et al.*, 2008).

A cultura de células 3D tornou-se um dos principais métodos de escolha na descoberta de medicamentos devido ao fato de que essas culturas permitem a interação célula-célula e célula-matriz muito parecida com as interações encontradas *in vivo*. Além disso, os modelos de cultura 3D usando células humanas reduzem o uso de modelos de camundongos que geralmente são custosos e retratam de forma imprecisa a eficácia e os efeitos colaterais dos medicamentos (LANGHANS, 2018).

1.5 Abordagens da bioengenharia para regeneração

1.5.1 Associação de células-tronco a biomateriais

Biomateriais e regeneração de tecidos representam dois campos de intensa pesquisa e rápido avanço. A sua combinação permitiu a utilização das diferentes características dos biomateriais para potencializar a expansão das células-tronco ou sua diferenciação em diversas linhagens celulares. Ademais, o uso de biomateriais na regeneração de tecidos otimizaria a geração de tecidos engenheirados em maiores dimensões e complexidade, permitindo uma aplicação clínica significativa.

O principal objetivo da bioengenharia de tecidos é o desenvolvimento de substitutos biológicos ou constructos funcionais para restaurar ou corrigir um defeito em tecidos ou órgãos. O uso de células-tronco na engenharia de tecidos gera um potencial para produzir tecidos específicos de acordo com a necessidade do paciente, bem como reduz o risco de rejeição imunológica. No entanto, a diferenciação completa das populações de células-tronco no alvo desejado, ainda é um desafio (EL-SERAFI, 2012). *in vivo*, as células-tronco existem em um microambiente ativo e complexo cujo fator fundamental é a MEC, que suporta as células e fornece pistas físicas e químicas que direcionam certas vias de sinalização e afetam a diferenciação celular (ABAGNALE *et al.*, 2015). Vários biomateriais foram projetados para imitar o efeito natural da MEC *in vitro* (HELLMUND e KOKSCH, 2019).

Um biomaterial pode ser definido como um material projetado para assumir uma forma que pode direcionar, mediante interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico (WILLIAMS, 2019). Esses materiais precisam ser biocompatíveis para serem aplicados *in vivo*, ou seja, desempenharem sua função terapêutica sem provocar quaisquer efeitos indesejáveis locais ou sistêmicos no receptor (WILLIAMS, 2008).

Atualmente, há uma ampla utilização de biomateriais na prática clínica, incluindo próteses de quadril, hastes de aço para fixação interna, próteses valvares cardíacas, stents vasculares, lentes oculares, materiais de contraste para ressonância magnética, bem como em materiais odontológicos e implantes.

Um tecido que tem recebido atenção na bioengenharia, principalmente na associação com biomateriais é o tecido ósseo. As lesões ditas críticas não regeneram

completamente devido à perda de tecido, fixação inapropriada, infecção ou vascularização inadequada (NG *et al.*, 2016). Dessa forma, há a demanda do desenvolvimento de abordagens que promovam o remodelamento e a regeneração do tecido ósseo, de modo que ele retome sua funcionalidade (ORCIANI *et al.*, 2017).

A utilização de biomateriais como substituto ósseo representa uma alternativa aos enxertos autógenos e é alvo permanente de pesquisas científicas. Para tanto, muitos estudos visam otimizar as propriedades do material para torná-lo mais semelhante aos autoenxertos. O enxerto autógeno ainda é considerado o padrão ouro na reconstrução de defeitos ósseos de tamanho crítico, pois apresenta propriedades osteoindutoras e osteogênicas. Entretanto, sua utilização depende de outro sítio cirúrgico como área doadora, havendo imprevisibilidade da quantidade do enxerto devido à reabsorção durante o período de cicatrização (GRADO *et al.*, 2018).

Os biomateriais sintéticos representam uma possibilidade na reconstrução óssea (GRADO *et al.*, 2018; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (HA), principal constituinte inorgânico da composição óssea e dentária, é amplamente pesquisada como biomaterial substituto ósseo (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013; RATNAYAKE *et al.*, 2016). Entretanto, a cristalinidade da HA sinterizada impacta suas características nanoestruturais, reduzindo sua capacidade de bioabsorção (RESENDE *et al.*, 2013).

Estudos anteriores propuseram a modificação química do HA substituindo o grupamento fosfato (PO_4^{2-}) pelo grupo carbonato (CO_3^{2-}) sintetizando assim a hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (nCHA) (HABIBOVIC *et al.*, 2010; VALIENSE *et al.*, 2015; CALASANS-MAIA *et al.*, 2015; CARMO *et al.*, 2018; SARTORETTO *et al.*, 2020).

Essas substituições alteram as características estruturais básicas da HA modificando suas propriedades mecânicas, solubilidade e capacidade de ligação óssea de forma a aperfeiçoar seu desempenho biológico e a mineralização óssea (VALIENSE *et al.*, 2015).

2 OBJETIVO

Adaptar testes toxicológicos em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em modelos 2D e 3D de cultivo para triagem de toxicidade *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

- a. Avaliar citotoxicidade e viabilidade, de acordo com o Teste para Predição da Toxicidade Oral Aguda (OECD 129) em monocamada, na linhagem celular de fibroblastos embrionários de camundongo (BALB /3T3 A1), e nas células primárias células-tronco/estromais derivadas do tecido adiposo (ASC).
- b. Normalizar testes de citotoxicidade em modelos 3D com as células de (BALB /3T3 A1) e (ASC).
- c. Calcular a concentração inibitória (IC50), a partir do controle positivo de toxicidade (SDS) e da nanopartícula (nCHA).
- d. Avaliar se a nCHA interfere na formação dos esferoides
- e. Determinar a concentração ideal de nCHA para formação dos esferoides.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento e expansão das células em monocamada

Para o isolamento das ASCs, foram utilizadas amostras de lipoaspirado subcutâneo, coletadas de doadores do sexo feminino com idade entre 18 a 55 anos, saudáveis, não obesos ou sem histórico anterior de obesidade (SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017), de acordo com os procedimentos aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (Protocolo de pesquisa 145/09, anexo I). A linhagem BALB /3T3 A1 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As ASCs foram isoladas pelo método de dissociação mecânica estabelecido pelo grupo de pesquisa (BAPTISTA *et al.*, 2009). Primeiramente, o lipoaspirado foi transferido para tubos de polipropileno de 50 mL (BD) contendo o mesmo volume do tampão de dissociação ACK (do inglês *Ammonium-Chloride-Potassium*, Lonza, São Paulo, Brasil). Posteriormente, os tubos foram agitados com auxílio de um vórtex por um minuto, três vezes. Em seguida, os tubos foram incubados por 15 minutos a 37°C. A suspensão obtida foi centrifugada a 900 x g por 15 minutos e em seguida lavada com PBS 0,01 M (do inglês, *Phosphate buffer solution*) para isolar as células da fração estromal vascular, que sedimentam. O sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS 0,01 M e semeado (10^5 células/cm²) em garrafas de cultura em meio quimicamente definido para MSCs humanas (do inglês *Mesenchymal stem cell basal medium – Chemically defined*, Lonza) acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) e 10000 U/ml de penicilina sódica com 10000 ug/mL de estreptomicina (Lonza), conforme instruções do fabricante.

As ASCs foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, a monocamada de células aderidas foi lavada com PBS 0,01 M a fim de remover células não aderentes e mantidas no meio de cultivo para expansão das ASCs, supracitado. Uma fração de ASCs foi distribuída em garrafas de cultura em uma densidade de $0,8 - 1,3 \times 10^4$ células/cm² para expansão e o restante foi criopreservado em nitrogênio líquido para posterior utilização.

A linhagem BALB /3T3 A1, obtida do BCRJ, foi cultivada em meio DMEM-High (*Dulbecco's Modified Eagle Medium- High glucose* (4,5g/L), Sigma Chemical Co, St.

Louis, Missouri, EUA), suplementado com 10% de SFB (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA), 10000 U/ml de penicilina sódica e 10000 ug/mL de estreptomicina (Lonza), mantida a 37°C e com uma atmosfera 5% de CO₂.

Após a verificação de 80% de confluência, a linhagem celular foi dissociada com solução de tripsina 0,125% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) e criopreservada em nitrogênio líquido para a geração de banco de células.

Todas as células cultivadas foram testadas quanto à presença de micoplasmas por PCR e bioluminescência, executados pelo Laboratório de Bioengenharia Tecidual (Labio) e Laboratório de Macromoléculas (Lamac), ambos da Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (Dimav).

3.2 Cultivo bidimensional em placa de 96 poços

As células criopreservadas foram descongeladas e cultivadas em DMEM (ASC com baixa glicose) (BALB /3T3 A1 com alta glicose), ambos suplementados com 500 µg/ml de penicilina sódica (LGC, São Paulo, Brasil), 500 µg/mL de estreptomicina e 10% de SFB e mantidas em estufa com 5% CO₂ a 37° C.

Ao atingir aproximadamente 80% de confluência, as células em monocamada foram dissociadas com solução de tripsina 0,125% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) e 0,78 mM de EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid, Ácido Tetra acético de Etilenediamina, Invitrogen, São Paulo, Brasil) por cinco minutos, caracterizando uma passagem, e plaqueadas novamente em garrafas para expansão. Essa passagem após o descongelamento é importante para estabilizar as células.

Para o ensaio de viabilidade de cultura 2D foi utilizado o ensaio de citotoxicidade aguda oral recomendado pela OECD, protocolo nº 129 (*Test Guideline* nº 129). Após atingir confluência de 80%, as células em monocamada foram dissociadas e uma parte foi plaqueada em uma placa de 96 poços (Eppendorf), com DMEM-Low glucose 10% SFB, e a outra parte foi separada para fabricação dos esferoides, utilizando meio para cultivo 3D. As densidades celulares foram definidas de acordo com as densidades óticas, que dever ser superiores a 0,3 nas fileiras de células viáveis (controle negativo – células não tratadas com substância). Como a BALB /3T3 A1 é a linhagem padrão do guia nº 129, sua densidade celular já é

preconizada pelo mesmo. Portanto, foi necessário definir apenas as densidades da ASC, conforme tabela abaixo.

Tabela 4. Densidades celulares utilizadas em cada tipo celular

Célula	Densidade celular 2D/poço
ASC	2×10^4
BALB /3T3 A1	3×10^3

3.3 Fabricação do hidrogel de agarose micromoldado

Os esferoides foram fabricados em um sistema de hidrogel de agarose micromoldado. Para a produção deste hidrogel micromoldado, foi utilizado um molde de silicone (MicroTissues® 3D Petri Dish®, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) contendo 81 projeções (Fig. 6). Para o preparo da agarose, foi pesada 1 g de agarose ultrapura (Invitrogen) e esterilizada por autoclavação, assim como a solução de 0,9% NaCl.

Essa solução de agarose a 2% foi solubilizada com o 0,9% NaCl no micro-ondas e foi dispensado um volume de 600 μ L dessa solução no centro de cada molde de silicone. Após 20 minutos, a agarose solidificou e pôde ser desenformada em um poço de uma placa de 12 poços (Kasvi).

Após, esse molde foi equilibrado com adição de 2 mL de meio DMEM low-glucose por 2x e depois em meio 3D, contendo ácido ascórbico (50 μ g/mL), ITS (Insulina, Transferrina e Selênio) (1%), penicilina e estreptomicina (1000 mg/mL) e albumina humana (1,25 μ g/mL) (Sigma). Cada meio foi mantido por 15 minutos em estufa com 5% CO₂ a 37° C. A figura abaixo (Fig. 3) esquematiza o processo de formação do micromolde de agarose.

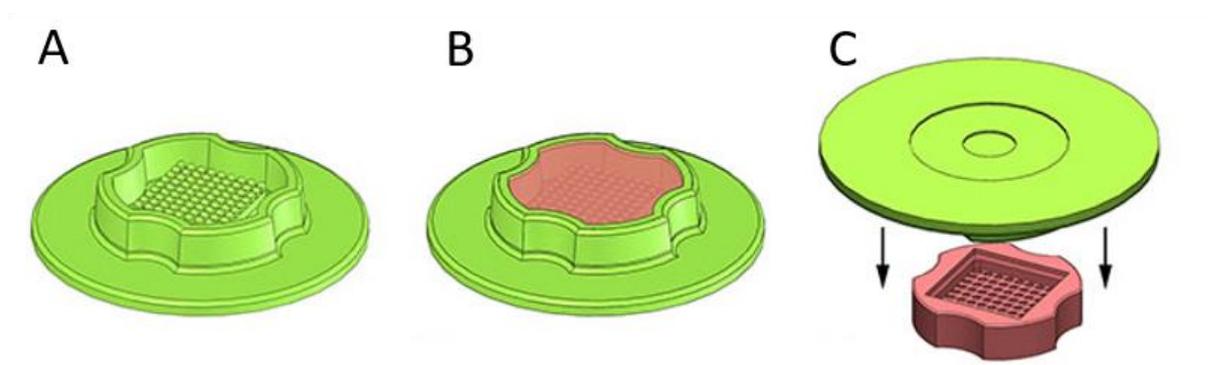


Figura 3. Processo de fabricação do micromolde de agarose.

3.4 Cultivo tridimensional em hidrogel de agarose micromoldado

Após a contagem das células em câmara de Neubauer, foi separado um total de 1×10^6 de cada célula em um tubo de polipropileno de 15 mL (Kasvi) para cada hidrogel micromoldado. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com 5 mL de solução PBS 0,01 M e centrifugadas a $400 \times g$ por 5 minutos, para remoção do SFB.

Posteriormente, o pellet formado foi ressuscitado em 120 μL em meio de cultivo de manutenção do cultivo tridimensional composto por Ácido ascórbico (50 $\mu\text{g/mL}$), ITS (Insulina, Transferrina e Selênio) (1%), penicilina e estreptomicina (1000 mg/mL) e albumina humana (1,25 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma).

Um volume final de 200 μL da suspensão celular foi dispensado no interior do hidrogel de agarose micromoldada. Após 40 minutos, as células sedimentaram para as ressecções do hidrogel e foi adicionado 2 mL do meio de manutenção supracitado e os moldes plaqueados foram postos na estufa úmida com 5% CO_2 a 37°C por 24h.

Tabela 5. Componentes do meio de cultivo 3D com as respectivas concentrações

Componente	Concentração
Ácido ascórbico	50 $\mu\text{g/mL}$
ITS (100x)	1x
Penicilina/estreptomicina	1000 mg/mL
Albumina	1,25 $\mu\text{g/mL}$

3.5 Fabricação dos esferoides associados a ncha

Para fabricar os esferoides associados à (nCHA), primeiramente as ASCs foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² (Corning) com 9×10^5 , para cada concentração de nCHA (0,01; 0,1; 1; 10; 50 e 100 µg/mL) e o grupo controle, sem nCHA. Foi utilizado meio *DMEM-Low glucose* suplementado com 500 µg/ml de penicilina sódica (LGC), 500 µg/mL de estreptomicina (LGC) e 10% de SFB (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) e foram mantidas em estufa com 5% CO₂ a 37° C até atingir 80% de confluência.

O pó da nCHA foi cedido pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e esterilizado por radiação gama. O processo de síntese encontra-se sob depósito de patente. Para preparar o extrato da nCHA, o pó foi pesado de forma a manter a esterilidade e diluído em *DMEM-Low glucose* puro, em uma concentração estoque de 1 mg/mL. As concentrações de uso foram preparadas no meio de manutenção das células, imediatamente antes do uso.

Quando a confluência ideal foi atingida (80%), a nCHA foi adicionada ao meio de manutenção nas concentrações descritas, em cada garrafa. Após 24h, cada garrafa foi tripsinizada e as células associadas a nCHA foram plaqueadas nos moldes conforme o item anterior.

Tabela 6. Concentrações de nCHA testadas no 2D e 3D

0,01 µg/mL	0,1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
------------	-----------	---------	----------	----------	-----------

3.6 Medição do diâmetro dos esferoides

Para medição do diâmetro dos esferoides, foram capturadas imagens digitais dos esferoides ao longo dos dias de cultivo, com o auxílio do microscópio óptico invertido equipado com câmera digital (Leica DFC 500). Os diâmetros maior e menor dos esferoides foram determinados com o software AxioVision Rel. 4.6.

3.7 Exposição da monocamada de ASC ao SDS

Foi utilizado o agente tensoativo aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) como um controle positivo de toxicidade. O preparo e exposição a esse agente foi feito conforme o guia 129 da OECD. As células foram plaqueadas em sextuplicata, em uma placa de 96 poços (Eppendorf, São Paulo, Brasil) e mantidas por 24h em estufa úmida com 5% CO₂ a 37°C.

O SDS foi preparado imediatamente antes do uso. Para isso, foi pesado 0,6 g do pó SDS para cada 3 mL de água destilada e filtrado em membrana de 0,22 µm, em uma concentração inicial de 200 mg/mL.

As diferentes concentrações de SDS foram preparadas em *DMEM-low* suplementado com 5% de SFB (para o SFB não mascarar possíveis efeitos toxicológicos) e 1% de PS. O fator de diluição de 1,47 (= $6\sqrt{10}$), dividindo-se o Log em seis parcelas equidistantes foi utilizado como referência para as concentrações finais de exposição ao SDS.

O SDS foi adicionado na monocamada plaqueada na placa de 96 poços. A placa foi deixada por 48h em estufa úmida com 5% CO₂ a 37°C. Após esse período, foi coletado o sobrenadante celular para posteriores análises (LDH) e a viabilidade celular foi analisada por retenção do corante vermelho neutro (NRU, da sigla em inglês) e pelo kit comercial *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay* (Promega, Madison, EUA).

Tabela 7. Concentrações de SDS usadas no 2D e 3D

6,8	10	14,7	21,5	31,6	46,4	68,1	100
µg/mL							

3.8 Exposição dos esferoides ao SDS

Os esferoides foram produzidos conforme supracitado. Foi feito um *coat* de agarose a 2% em uma placa de 96 poços (Eppendorf) para impedir a aderência dos esferoides a ela. Foi adicionado um esferoide por poço em sextuplicata e adicionado SDS nas mesmas concentrações da monocamada, entretanto, utilizando meio

DMEM-low suplementado com ácido ascórbico (50 µg/mL), ITS (1%), PS (1000 mg/mL) e albumina humana (1,25 µg/mL), próprio para o cultivo de esferoides.

Essa placa foi mantida por 48h em estufa úmida com 5% CO₂ a 37°C. Após esse período, foi coletado o sobrenadante celular para posteriores análises (LDH) e a viabilidade celular foi analisada através do kit comercial *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay* (Promega, Madison, EUA).

3.9 Viabilidade celular 2D – captação de vermelho neutro (NRU)

O teste de viabilidade de vermelho neutro foi feito na monocamada incubada por 48h com diferentes concentrações de SDS. Esse ensaio também foi feito para diferentes concentrações da (nCHA).

Para o preparo do estoque do corante (2,5 mg/mL), foi pesado em balança analítica 0,025 g de vermelho neutro (Sigma, Missouri, EUA) para cada 10 mL de água destilada estéril e filtrado em membrana de 0,22 µm. Essa solução foi homogeneizada em vórtex por 10 minutos, ao abrigo da luz. A mesma foi deixada *overnight* em estufa úmida com 5% CO₂ a 37°C.

Imediatamente antes do uso, o corante foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos para separar eventuais cristais. A solução de uso (25 µg/mL) foi feita em *DMEM-low* suplementado com 5% de SFB e 1% de PS. As células foram lavadas com PBS 0,01 M e foi adicionado 250 µl/poço da solução de uso do corante e mantido por 3h em estufa úmida com 5% CO₂ a 37°C, ao abrigo da luz.

Após esse período, a placa foi analisada para verificar possível formação de cristais de vermelho neutro e em caso negativo, foi dado prosseguimento ao ensaio. Em seguida, a placa foi lavada com PBS 0,01 M e o corante foi revelado adicionando 100 µl/poço de uma solução de 49% de água destilada, 1% de ácido acético glacial e 50% de etanol. A placa foi posta em um agitador de placas por 30 minutos sob abrigo de luz e depois permaneceu em repouso por 5 minutos. A absorbância foi medida utilizando o leitor de microplacas *Synergy H4 Hybrid Reader* em 540 nm.

3.10 viabilidade celular 2D – kit comercial

Com a finalidade de comparação com o teste certificado (NRU) foi utilizado o kit comercial *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay* (Promega, Madison, EUA). Foi realizado na monocamada exposta ao SDS ou nCHA por 48h. O ensaio foi realizado conforme informações do fabricante. Sumariamente, foi adicionado o reagente de detecção do kit em um volume igual ao presente em cada poço (v/v). A placa foi homogeneizada por 2 minutos em *shaker* orbital para induzir a lise celular. Após, foi deixada em repouso por 10 minutos na ausência de luz, para estabilizar o sinal de luminescência. A luminescência foi registrada no espectrofotômetro *Synergy H4 Hybrid Reader*.

3.11 viabilidade celular 3D – kit comercial

Após 48h de exposição dos esferoides às diferentes concentrações de SDS (6,8; 10; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100 µg/mL), foi realizada a análise de viabilidade através do kit comercial *CellTiter-Glo® 3D* (Promega, Madison, EUA). O ensaio foi feito conforme instruções do fabricante. Sumariamente, um volume de 50 µl de cada poço, juntamente com o respectivo esferoide, foi transferido para uma placa de fundo e laterais pretas de 96 poços sem tratamento de aderência (Costar), própria para leitura de luminescência. Foi adicionado 50 µl do reagente do kit em cada poço e homogeneizado vigorosamente por 5 minutos para causar lise celular. Após, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 25 minutos para estabilizar o sinal de luminescência, ao abrigo da luz. A luminescência foi registrada em um espectrofotômetro *Synergy H4 Hybrid Reader*.

3.12 Citotoxicidade celular - LDH

Foram coletados 10 µl/poço dos sobrenadantes celulares dos cultivos 2D e 3D (expostos ao SDS e à nCHA, ambos por 48h) em 190 µl de tampão de armazenamento de LDH (200 mM Tris-HCl (pH 7,3), glicerol a 10%, BSA a 1%) e armazenados a -20°C até o momento do ensaio. O reagente de detecção foi preparado misturando o *LDH detection enzyme mix* com a *reductase substrate*, conforme instruções do

fabricante. Em uma placa preta de 96 poços (Costar), foi adicionado 50 µl da amostra conservada em tampão e 50 µl do reagente de detecção de LDH e incubado em temperatura ambiente por 60 minutos. A luminescência foi registrada em um espectrofotômetro *Synergy H4 Hybrid Reader*.

3.13 Microscopia eletrônica de transmissão

Para o processamento para MET, os esferoides foram coletados do hidrogel de agarose micromoldado e lavados com PBS 0,01 M. As amostras foram fixadas em glutaraldeído (Sigma) 2,5% em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 0,1 M. Posteriormente, os esferoides foram lavados com o tampão cacodilato de sódio, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (Sigma) diluído em cacodilato de sódio 0,1 M e mantidos ao abrigo de luz. Em seguida, os esferoides foram lavados com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por três vezes. Sequencialmente, os esferoides foram desidratados por lavagens seriadas em acetona. Ao final, as amostras foram gradualmente embebidas em resina epon (Sigma) diluída em acetona a 60°C por 48h. As secções ultrafinas (<150 nm) dos esferoides com a hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada foram obtidas utilizando ultramicrótomo RMC (PT-XL PowerTome). As imagens foram obtidas e cedidas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas.

3.14 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para análise estatística, *GraphPad Prism 8* (Inc., San Diego, CA, EUA) foi usado. Primeiramente, foi analisada a distribuição de normalidade, em caso afirmativo foi usado o teste ANOVA one way para testes paramétricos. Para experimentos cuja distribuição foi não Gaussiana, foi utilizado o teste ANOVA one way não-paramétrico, com o Welch's ANOVA. Para o teste Post-Hoc, foi utilizado Dunn's. A significância entre os grupos foi considerada para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.12 Ensaio 2D

4.12.1 SDS

4.12.1.1 Ensaio de Captação de Vermelho Neutro - Balb/c BALB /3T3 A1 A1

As células de linhagens de fibroblastos BALB /3T3 A1 foram semeadas em placas de 96 poços de fundo chato, para a produção de monocamas (2D). Após 24h, foi aplicado SDS nas monocamadas de fibroblastos BALB /3T3 A1 (padrão do teste) nas concentrações de 0 a 100 µg/mL de acordo com as recomendações do guia de citotoxicidade da OECD nº129. Ao final do ensaio, a viabilidade foi revelada com o corante vital vermelho neutro.

O ensaio certificado para monocamada é o teste de retenção do corante Vermelho Neutro. Substâncias como o SDS danificam as bicamadas lipídicas sendo possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular.

Foi observado que a concentração recomendada pela OECD de 3×10^3 células/poço não foi o suficiente para que ao final do teste densidades óticas superiores a 0,3 nas fileiras de células viáveis fossem obtidas (controle negativo – células não tratadas com substância). Sendo assim, o resultado de morte celular no ensaio do BALB /3T3 A1 gerou uma IC50 abaixo do descrito na literatura para o SDS (39 µg/mL) de 13,21 µg/mL. Assim, o ensaio foi repetido com 10^4 células/poço.

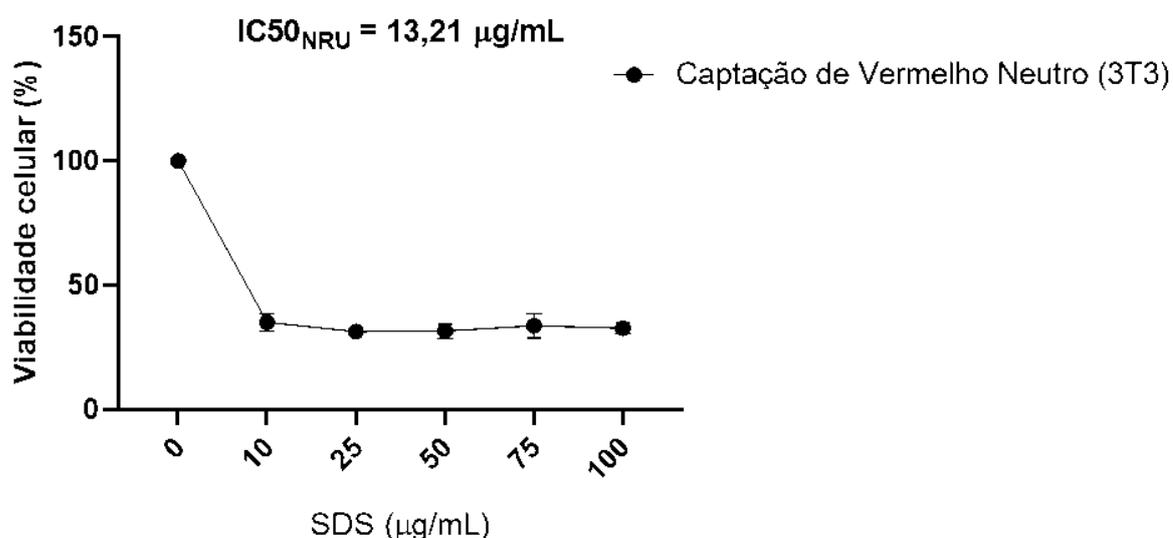


Figura 4. Análise de viabilidade celular da 3T3. Análise da viabilidade celular em relação à concentração de SDS. A viabilidade celular decai com o aumento da concentração de SDS, no entanto, não foi possível obter IC₅₀ determinado pelo guia da OECD, pois a densidade óptica obtida foi menor que a recomendada pela OECD. n=1

4.12.1.2 ASC é um modelo celular adequado para capturação de vermelho neutro (NRU) em ensaios citotóxicos

A primeira questão abordada com este estudo foi se a ASC poderia ser utilizada para realizar o ensaio de capturação de vermelho neutro com a mesma eficiência das células BALB /3T3 A1, que é a linhagem celular de referência e se eram adequadas para responder a uma substância de referência, sabidamente citotóxica, como o SDS, um produto químico GHS classe 4 (GHS, do inglês, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*).

As fotomicrografias mostram as monocamadas de ASCs após exposição a diferentes concentrações de SDS por 48h. As setas brancas indicam células mortas, identificadas pela perda da sua morfologia normal, fibroblastóide, se tornando arredondadas e soltas sobre a monocamada celular (Fig. 5A).

Ainda para analisar a responsividade dessas células frente a um ensaio de citotoxicidade, a viabilidade celular foi avaliada através de um método *in vitro* alternativo aos testes em animais para estimar doses iniciais para os testes de toxicidade oral sistêmica - Protocolo OECD n° 129.

Como resultado, a redução da viabilidade celular ocorreu de maneira dose-dependente de SDS demonstrando que as ASCs respondem efetivamente (Fig. 5B). A concentração inibitória (IC50) foi calculada utilizando o software *GraphPad Prism* 8.0.1. A IC50 obtida para as ASCs foi de aproximadamente 77 µg/mL.

Outro questionamento era se o kit comercial seria comparável. Os resultados obtidos em ambos ensaios foram análogos e sem diferença estatística entre eles. Portanto, o resultado obtido com o kit comercial pode ser considerado compatível com o ensaio certificado pela OECD.

Ambos ensaios foram comparados por Two-way ANOVA e apresentaram diferenças significativas entre o controle e as demais concentrações de SDS analisadas.

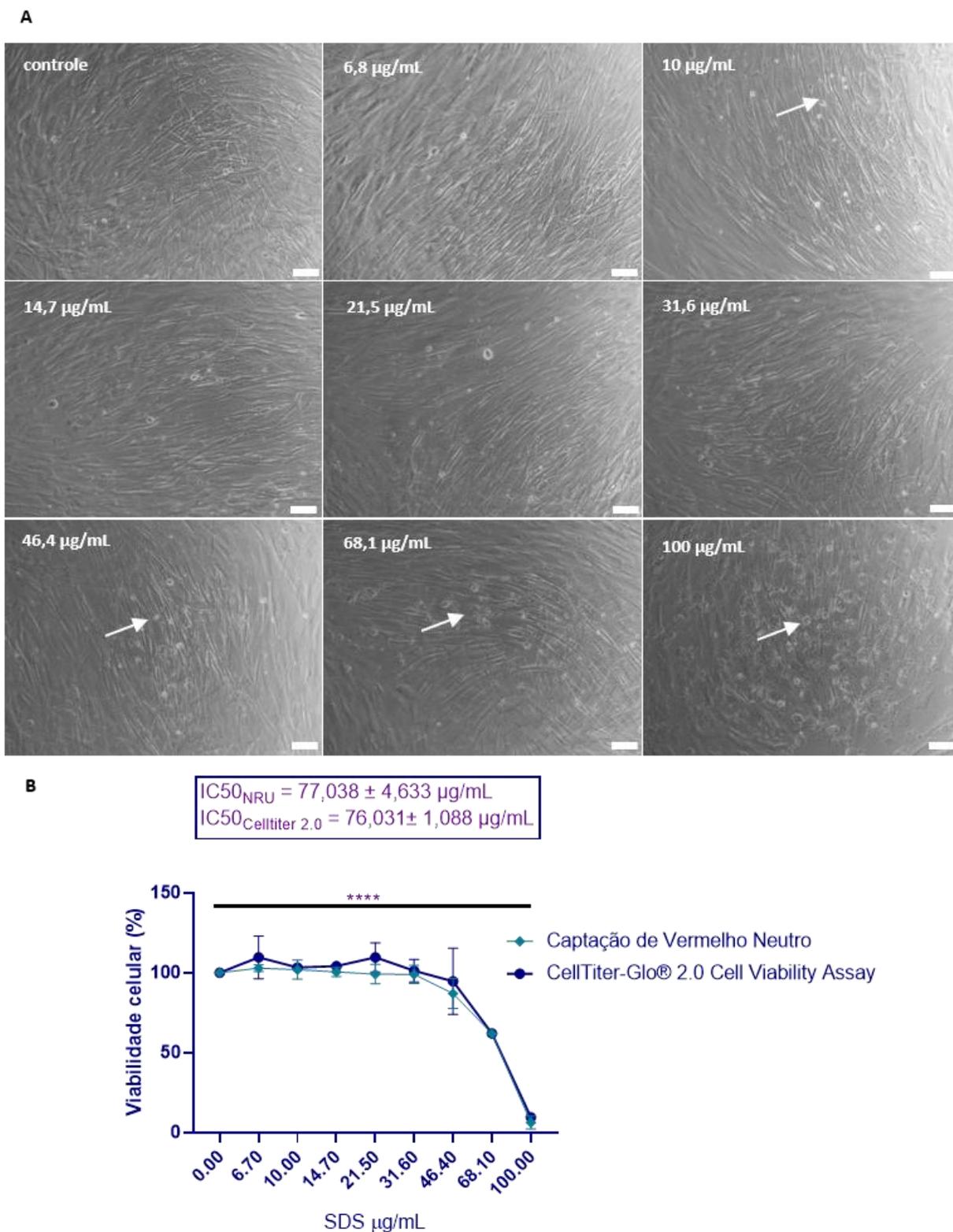


Figura 5. Análise de viabilidade celular das ASC na cultura 2D. As ASCs e o kit comercial são adequados para ensaios de toxicidade *in vitro* 2D. As ASCs foram tratadas por 48 h com diferentes diluições de SDS e após foram incubadas com solução de vermelho neutro por 3 h. A citotoxicidade do

SDS é demonstrada pela ausência ou redução na captação de vermelho neutro em comparação com o controle. (A) Células ASCs foram tratadas por 48h com diferentes concentrações de SDS e analisadas através do ensaio vermelha neutro ou pelo kit. As setas apontam células mortas. (B) Curvas dose-dependentes similares obtidas com o ensaio recomendado pela OECD x kit comercial testado. Os dados são expressos como média \pm DP. **** representa diferença estatística significativa. Os dados foram avaliados por two-way ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações com o teste Dunn's ($p < 0,0001$). Magnificação 10x. Barra de escala: 100 μ m. Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.12.1.3 SDS aumenta a liberação de LDH em cultivo de ASC

Para avaliar a citotoxicidade do SDS nas ASCs, foi utilizado um kit comercial que mede a liberação de LDH no sobrenadante do cultivo celular. O Ensaio de Citotoxicidade por LDH pode ser usado para determinar a morte celular após o tratamento com uma droga ou composto citotóxico. A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica solúvel estável presente em muitos tipos celulares, sendo rapidamente liberada no meio de cultura de células após o rompimento da membrana plasmática. No kit utilizado, A LDH catalisa a oxidação do lactato com redução concomitante de NAD^+ em NADH. A redutase usa NADH e substrato de redutase para gerar luciferina, que é convertida em um sinal bioluminescente pela Luciferase. O sinal de luz gerado é proporcional à quantidade de LDH presente.

Com isso, pôde-se notar que ocorre aumento da citotoxicidade dependente da concentração de SDS em contato com a monocamada (Fig. 6).

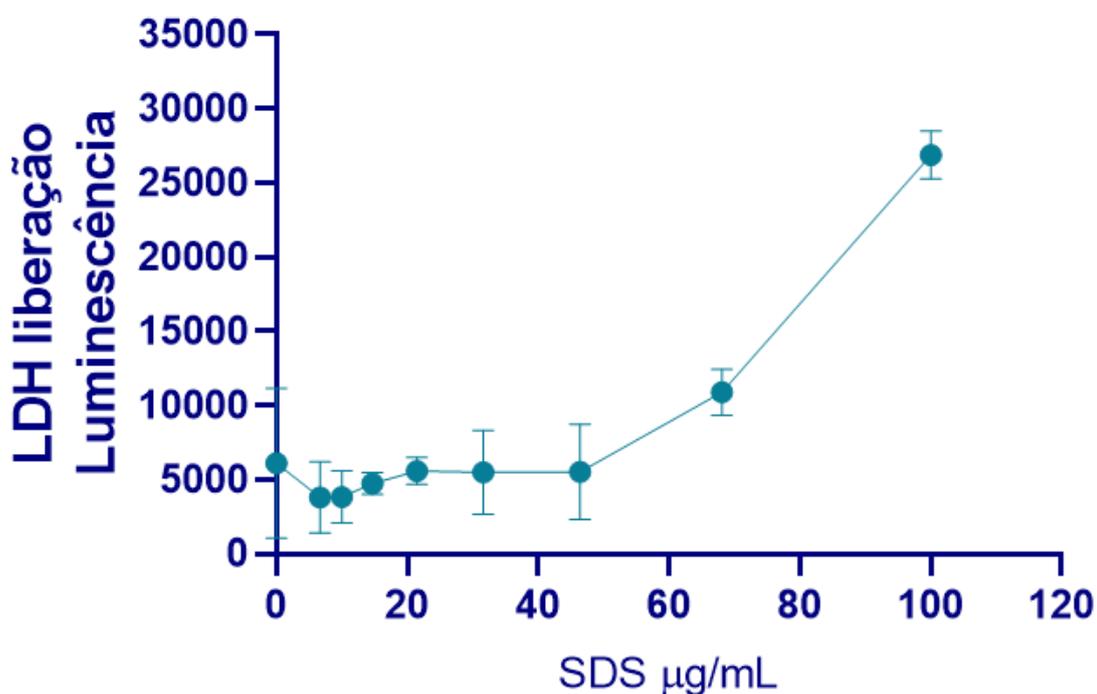


Figura 6. Liberação de LDH por concentração de SDS no cultivo 2D. A liberação de LDH, medida por luminescência, aumenta de forma proporcional ao aumento da concentração de SDS. Esse resultado corrobora com o obtido anteriormente na captação de vermelho neutro, um ensaio certificado pela OECD (Fig. 5B). Os dados foram avaliados por two-way ANOVA não paramétrico seguido de múltiplas comparações com o teste Dunn's ($p < 0,0001$). Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.13 Ensaios 3D

4.13.1 SDS

4.13.1.1 Observação da viabilidade celular dos esferoides de BALB /3T3 A1 diante da exposição ao SDS

Assim como na monocamada, os esferoides foram expostos a concentrações crescentes de SDS, com a finalidade de averiguar sua responsividade a esse detergente.

Inicialmente, durante o desenho do teste em 3D acreditávamos que os esferoides seriam bem mais resistentes ao SDS e, portanto, deveríamos utilizar

concentrações maiores dessa substância. Dessa forma, usamos as seguintes concentrações de SDS:

Tabela 8. Concentrações de SDS no 3D

10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
---------------------	---------------------	----------------------	----------------------	-----------------------

Visualmente, os esferoides demonstraram responder ao SDS de maneira dose-dependente, reduzindo a viabilidade, por desagregação celular, conforme aumentava-se a concentração de SDS (Fig. 7).

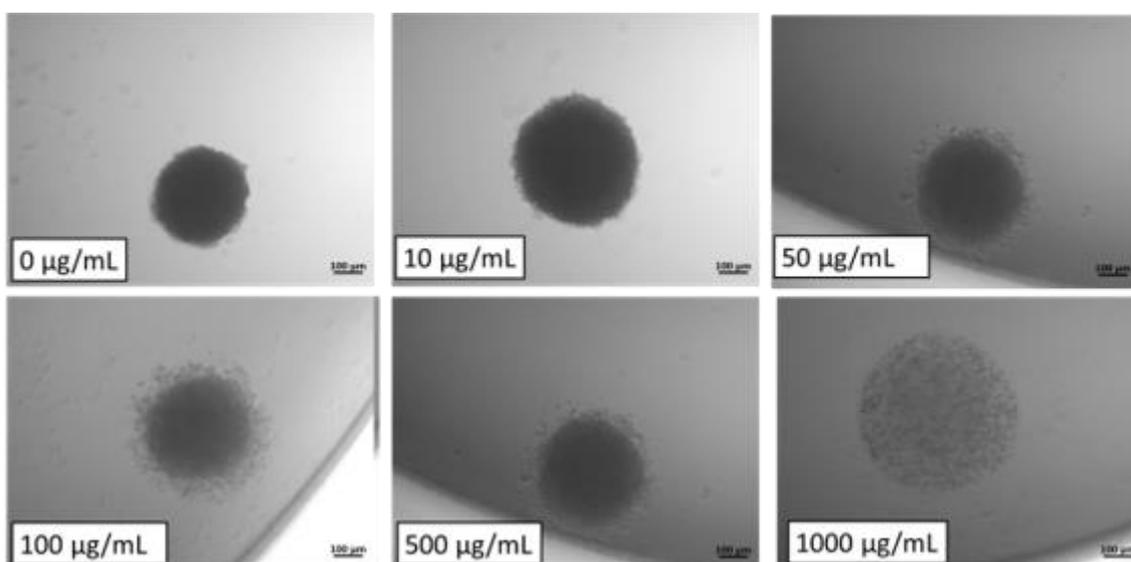


Figura 7. Morfologia dos esferoides de 3T3 expostos a SDS. Os esferoides de BALB /3T3 A1 apresentaram alteração na compactação conforme aumento da concentração de SDS, sugerindo que os esferoides reduzem a viabilidade celular com o aumento da concentração de SDS, por se desfazerem.

4.13.1.2 Avaliação da viabilidade celular dos esferoides de ASC por exposição ao SDS

Os esferoides expostos ao SDS tiveram sua compactação celular afetada conforme aumento da concentração do detergente (Fig. 8A).

Para determinar a IC50 dos esferoides foi utilizado o kit comercial específico para cultivos tridimensionais, um método para determinar o número de células viáveis em cultura de células 3D com base na quantificação do ATP presente, um indicador para a presença de células metabolicamente ativas. Quando as células perdem a integridade da membrana, perdem a capacidade de sintetizar ATP e as ATPases endógenas rapidamente esgotam qualquer ATP remanescente do citoplasma. A IC50 determinada foi de aproximadamente 9,7 µg/mL (Fig. 8 B).

Como resultado, a viabilidade celular dos esferoides decaiu de maneira dose-dependente do SDS, se comportando da mesma maneira que a monocamada. Assim, os resultados obtidos com os esferoides podem ser comparados aos atingidos com a monocamada de ASC. Estatisticamente, a perda da viabilidade celular foi significativamente diferente a partir do tratamento com concentração de 21,5 µl de SDS.

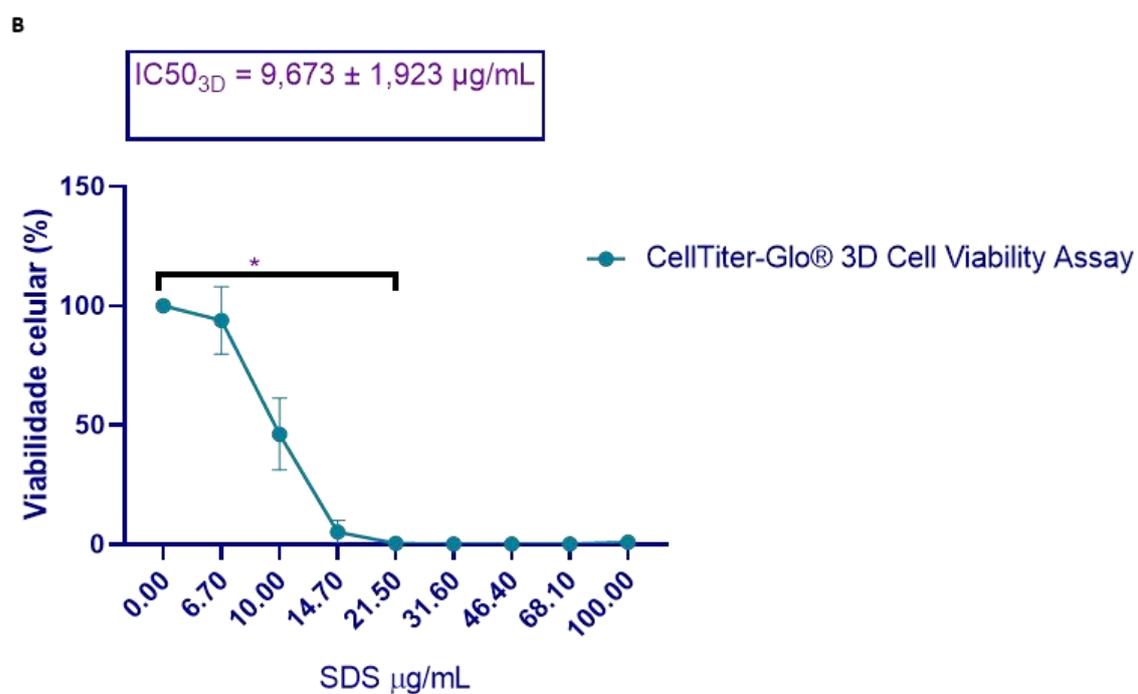
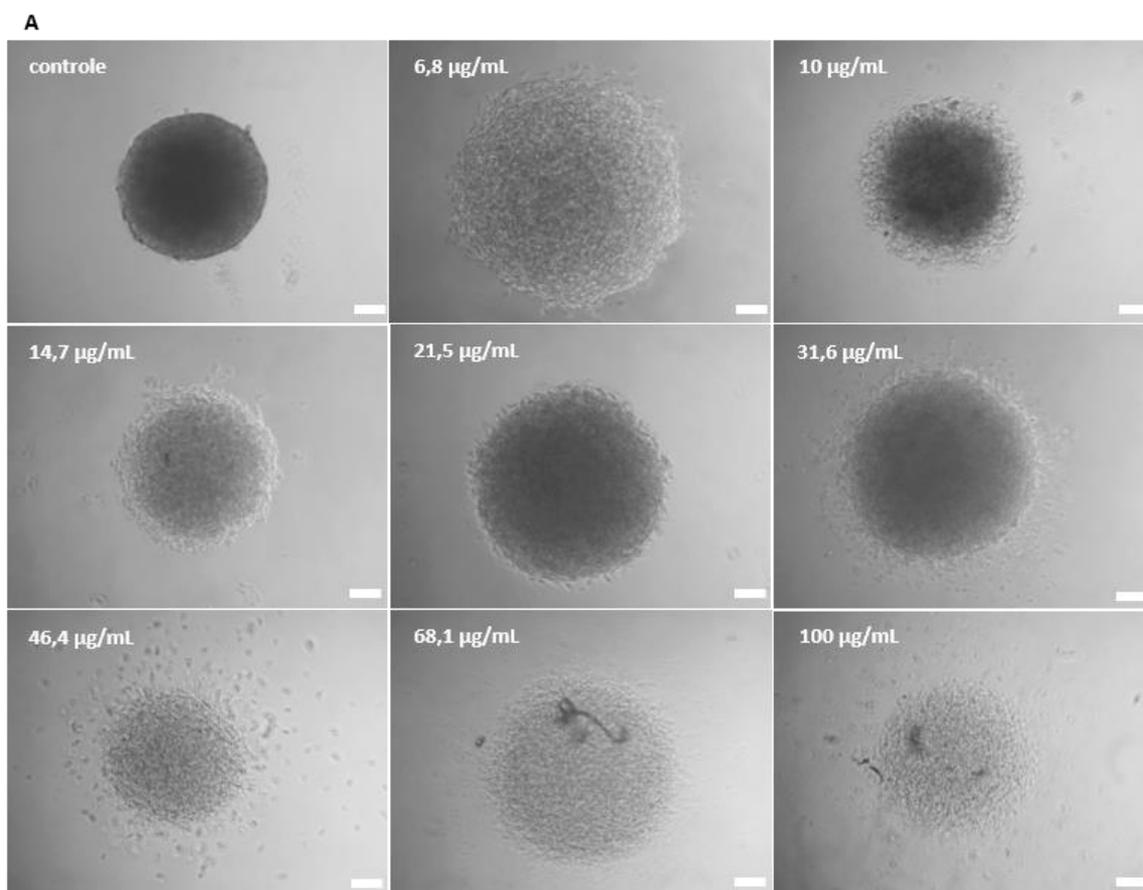


Figura 8. Análise de viabilidade celular dos esferoides de ASC expostos a SDS. Os esferoides reduziram a viabilidade celular conforme foi aumentada a concentração de SDS assim como ocorreu com a monocamada. (A) Fotomicrografia dos esferoides expostos ao SDS mostrando a redução da

coesão celular com aumento da concentração de SDS. (B) Redução do ATP, medido pelo kit comercial Celltiter-glo 3D, concomitante com aumento de SDS. Os dados são expressos como média \pm DP. Os dados foram avaliados por two-way ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações com o teste Dunn's ($p < 0,005$). Magnificação 10x. Barra de escala: 100 μ m. Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.13.1.3 Aumento na liberação de LDH das ASCs frente ao tratamento com SDS

Para o cultivo tridimensional, as concentrações de SDS adequadas para avaliar a liberação de LDH foram até 21,5 μ g/mL, pois em concentrações maiores, houve decréscimo da liberação, com desvio padrão acentuado.

Até essa concentração (21,5 μ g/mL), houve liberação crescente de LDH, diretamente proporcional à concentração de SDS, conforme ocorreu na monocamada. Houve diferença estatística entre 6,8 e 21,5 μ g/mL; 10 e 21,5 μ g/mL bem como entre 14,7 e 21,5 μ g/mL (Fig. 9)

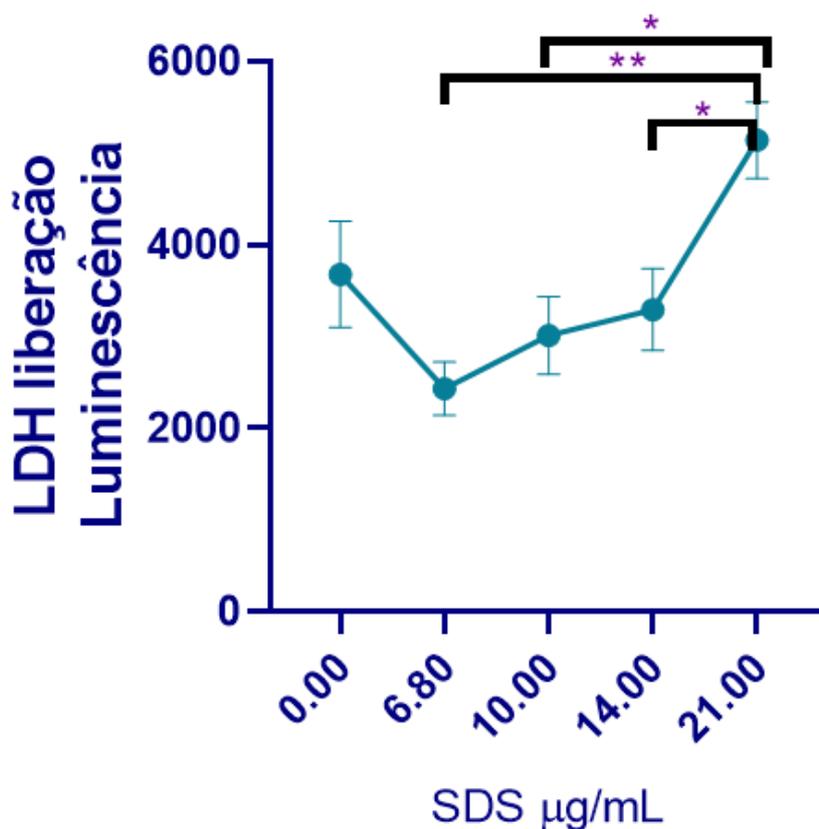


Figura 9. Análise da liberação de LDH nos esferoides de ASC expostos a SDS. A Liberação de LDH aumentou de acordo com a concentração de SDS nos esferoides. A concentração limite de SDS adequada para esse ensaio foi de 21,5 $\mu\text{g/mL}$. Os dados foram avaliados por two-way ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações com o teste Dunn's (* $p < 0,005$; ** $p < 0,0001$). Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.14 Ensaios 2D

4.14.1 Nanopartícula – nCHA

4.14.1.1 Nanopartícula nCHA não apresentou efeito citotóxico em monocamada

Após as avaliações de citotoxicidade com o controle positivo, tratamento padrão com SDS, foram realizados ensaios de exposição às nanopartículas com as células com potencial de aplicação em protocolos de medicina regenerativa e correspondentes às células humanas, isto é, nas ASCs.

As nanopartículas nCHA, cuja síntese está em processo de patente, foram cedidas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), do Rio de Janeiro. As nanopartículas foram esterilizadas por irradiação gama, pelo instituto fabricante. O pó da nCHA foi bem diluído e homogeneizado no meio base (DMEM - low glucose), sem apresentar agregados insolúveis.

Após as células ASC terem aderido à placa de cultivo de 96 poços, foram adicionadas diferentes concentrações de nCHA preparadas no meio de manutenção. Após 48h de exposição, a placa foi tratada com o reagente vermelho neutro para avaliação da viabilidade celular. Os resultados obtidos com esse ensaio, com a nCHA, foram contrapostos aos aferidos com o SDS.

As fotomicrografias mostram as monocamadas de ASC expostas às diferentes concentrações de nCHA. As setas indicam a deposição das nanopartículas sobre a monocamada celular, sendo mais notáveis em maiores concentrações (Fig. 10 A).

A comparação entre os ensaios de vermelho neutro (SDS x nCHA) mostraram que as ASCs, responsivas a substâncias citotóxicas, não apresentaram redução da viabilidade quando expostas à nanopartícula, demonstrando que a nCHA não teve ação citotóxica nas células, em monocamada (Fig. 10 B).

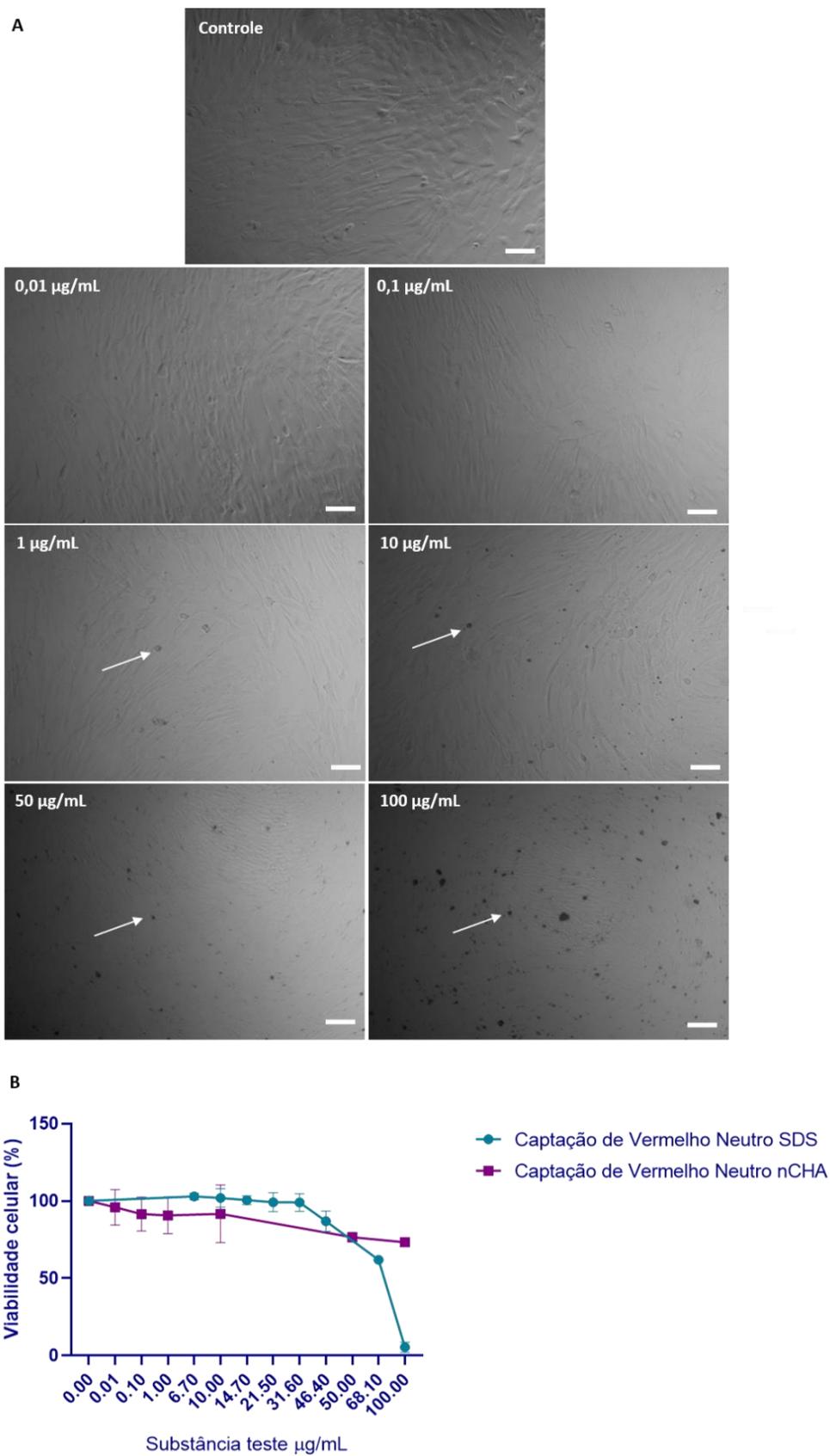


Figura 10. Viabilidade celular da monocamada de ASC exposta a nCHA. A nCHA não demonstrou atividade citotóxica nas ASCs em monocamada. (A) Monocamada exposta a diferentes concentrações

de nCHA, as setas indicam a deposição da nanopartícula sobre as células. (B) A comparação da viabilidade celular entre SDS e nCHA mostrou que a nanopartícula não é citotóxica. Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.14.1.2 O kit comercial foi comparável ao ensaio certificado em monocamada, com nCHA

Ao contrapor os resultados do ensaio de NRU *versus* kit comercial (Celltiter-Glo 2.0) em monocamada, observa-se que o kit é adequado para medir a toxicidade e ser comparável ao ensaio certificado. Utilizando Two-way ANOVA não paramétrico seguido de múltiplas comparações com o teste Dunn's não houve diferença significativa entre os ensaios captação de vermelho neutro e o kit comercial, nem com SDS nem nCHA (Fig. 11). Dessa forma, pode-se inferir que os resultados podem ser comparáveis.

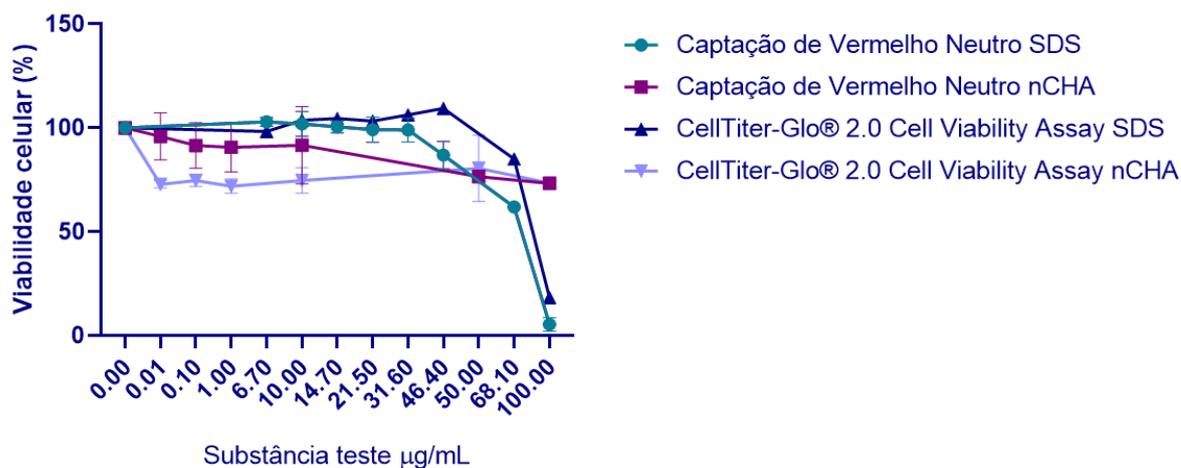


Figura 11. Comparação das análises de vermelho neutro e quantificação de ATP. O kit comercial, que mede ATP, é comparável ao ensaio certificado pela OECD para avaliar citotoxicidade com a nanopartícula. Os ensaios de captação de vermelho neutro x kit com a respectiva substância teste retornaram um resultado similar. Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.14.1.3 A nCHA apresentou baixa liberação de LDH

Outro parâmetro empregado para avaliar a citotoxicidade foi a liberação de LDH. A quantidade de LDH presente no meio extracelular é proporcional à quantidade de células mortas ou danificadas.

Dessa forma, a nCHA mostrou não ter atividade citotóxica, principalmente quando comparada ao agente comprovadamente citotóxico – SDS.

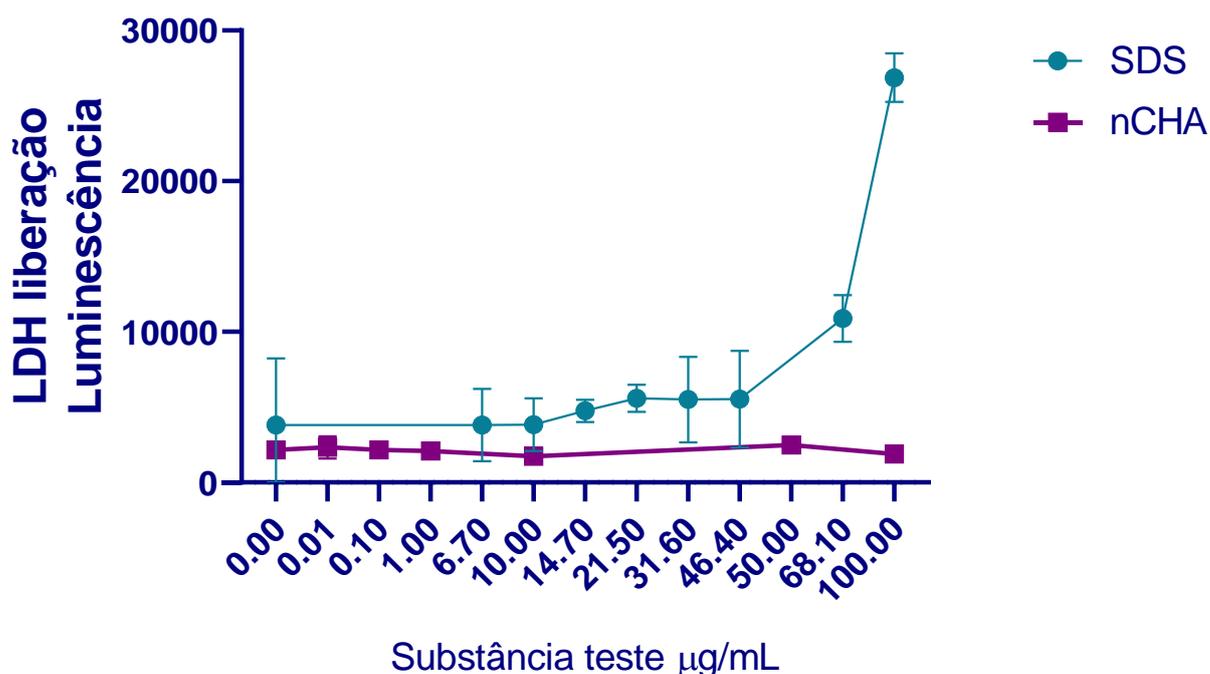


Figura 12. Liberação de LDH em cultivo 2D de ASC exposto a SDS versus nCHA. Comparação da liberação de LDH na presença de SDS e nCHA. Como esperado, o SDS foi citotóxico, representado pela liberação de LDH. No entanto, a presença de nCHA não aumentou a liberação de LDH em monocamada, mesmo diante das maiores concentrações de nCHA testadas. Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.15 Ensaios 3D

4.15.1 nCHA

4.15.1.1 A nCHA não afetou a formação dos esferoides

Primeiramente, foi analisada se a nanopartícula nCHA afetaria a agregação celular e conseqüentemente a formação do esferoide, visto que, para a engenharia de

tecidos, as nanopartículas devem ser associadas a modelos tridimensionais e, portanto, não devem interferir na sua formação.

Para a produção dos esferoides, inicialmente foi realizada a fabricação do hidrogel de agarose micromoldado a partir do molde de silicone 3D Petri Dish®, conforme esquema abaixo. Cada hidrogel de agarose micromoldado formado apresenta 81 ressecções, de forma que, são gerados 81 esferoides após a semeadura das células (Fig. 13).

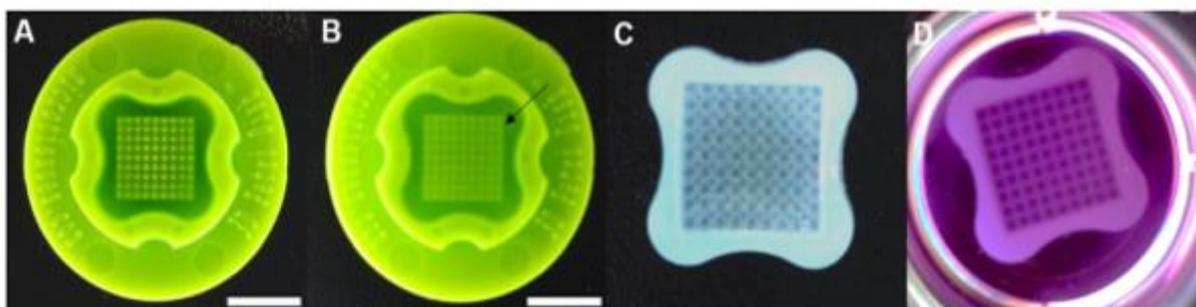


Figura 13. Etapas de preparo da agarose micromoldada em 3D Petri Dish®. (A) Molde de silicone 3D Petri Dish® contendo 81 projeções na região central. (B) Molde de silicone após ter sido dispensada a agarose em seu interior. A seta aponta a região em que a agarose se deposita após ser dispensada. Barra de escala de 1 cm. (C) Hidrogel de agarose micromoldada desenformada do molde, com as ressecções. (D) Hidrogel de agarose micromoldada inserida no poço da placa de cultura e adicionado meio de cultura.

A monocamada celular foi exposta à cada concentração de nCHA e, após 24h, foi tripsinizada e plaqueada, cada concentração em 1 molde, para formar os esferoides. Portanto, foram formados 81 esferoides com cada concentração de nCHA.

A formação dos esferoides não foi afetada, permitindo a aglomeração e coesão celular na presença de todas as concentrações de nanopartícula (Fig. 14 A).

Para analisar se houve diferença entre o tamanho dos esferoides expostos a nCHA foi realizada a medição dos diâmetros maior e menor dos esferoides. Ocorreu diferença estatística entre os esferoides controle, sem nCHA, e os esferoides na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de nCHA. Os esferoides associados à maior concentração da nanopartícula tornaram-se menores que os controles, possivelmente pelo desprendimento de nanopartículas e células à estrutura esferoidal. Houve uma variação acentuada entre os grupos, demonstrada pelo desvio padrão (Fig. 14 B).

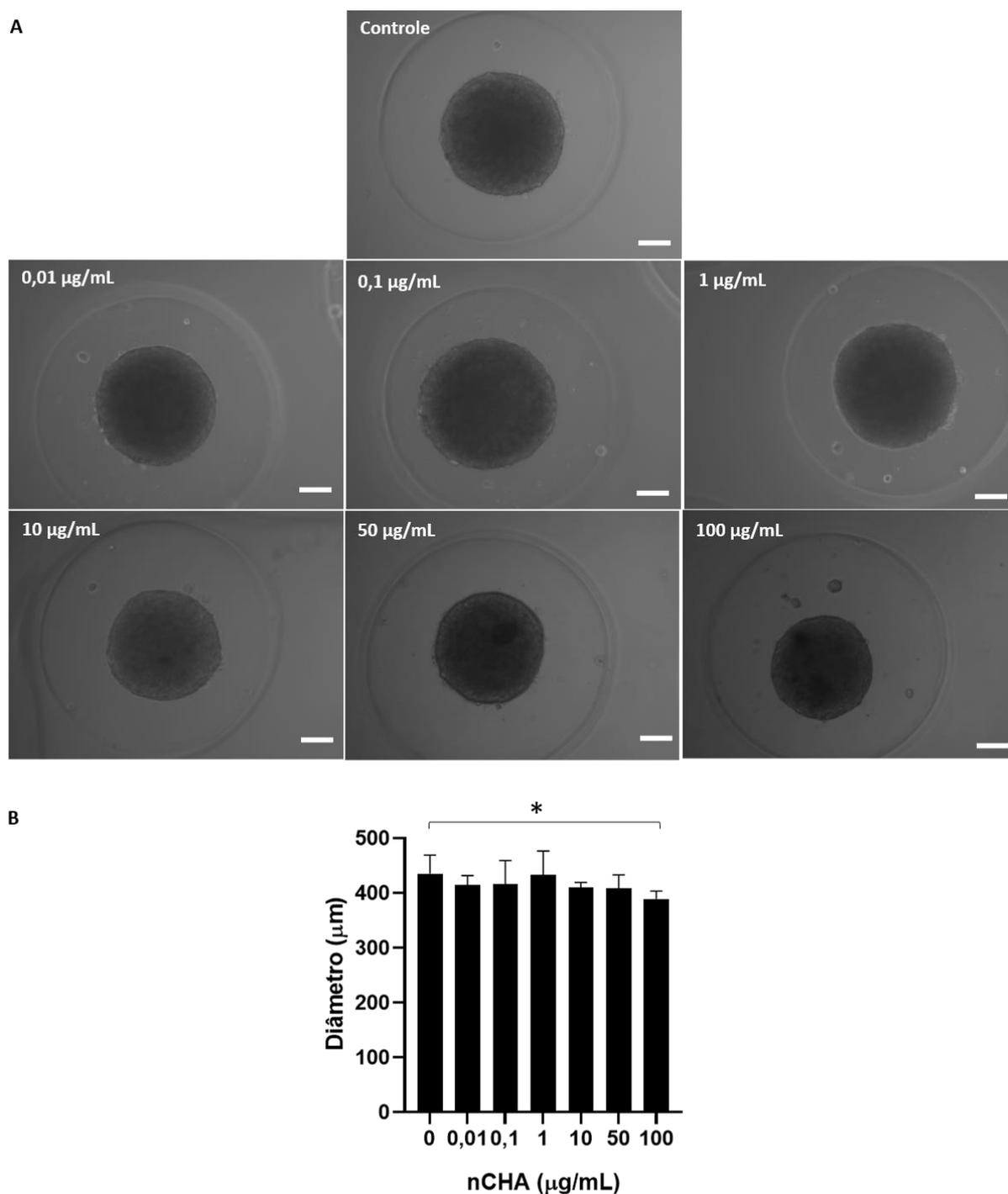


Figura 14. Medição de tamanho dos esferoides de ASC expostos a nCHA. A nCHA não interferiu na formação dos esferoides mas a maior concentração reduziu o diâmetro em relação ao controle. (A) Fotomicrografias mostrando a formação dos esferoides associados à nCHA, após 24h de plaqueamento nos moldes. (B) A concentração de 100 µg/mL de nCHA reduziu o diâmetro dos esferoides em relação ao controle. Os dados foram avaliados por two-way ANOVA paramétrico seguido de múltiplas comparações com o teste Dunn's ($p < 0,005$). Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.15.1.2A nCHA em esferoides gerou baixa liberação de LDH

Assim como na monocamada, os esferoides exibiram uma baixa e constante liberação de LDH, demonstrando que a nCHA não apresentou atividade citotóxica. Para esse ensaio, foram utilizadas todas as concentrações testadas da nanopartícula (Fig. 15).

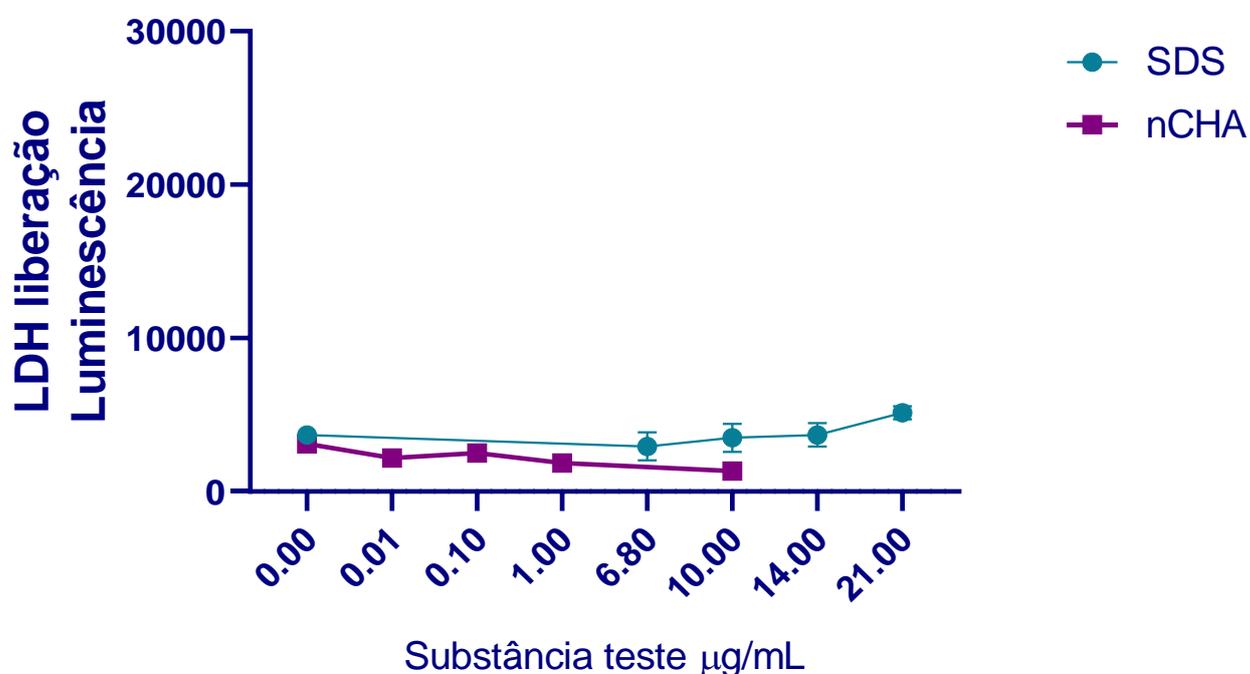


Figura 15. Comparação da liberação de LDH dos esferoides de ASC expostos a SDS ou nCHA. O SDS, por ser citotóxico, causou leve aumento na liberação de LDH, no entanto, a nCHA não aumenta a liberação de LDH em esferoides. Esses resultados indicam que a nCHA não tem atividade citotóxica. Resultado de três experimentos independentes em sextuplicata.

4.15.1.3A análise ultraestrutural dos esferoides sugere que a nCHA está internalizada

Com o objetivo de observar a ultraestrutura celular e investigar a localização da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada nos esferoides, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de transmissão. Esse ensaio foi realizado com esferoides associados a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nCHA. A presença de nCHA no interior dos esferoides, indicada pelas setas azuis, sugere internalização da nCHA.

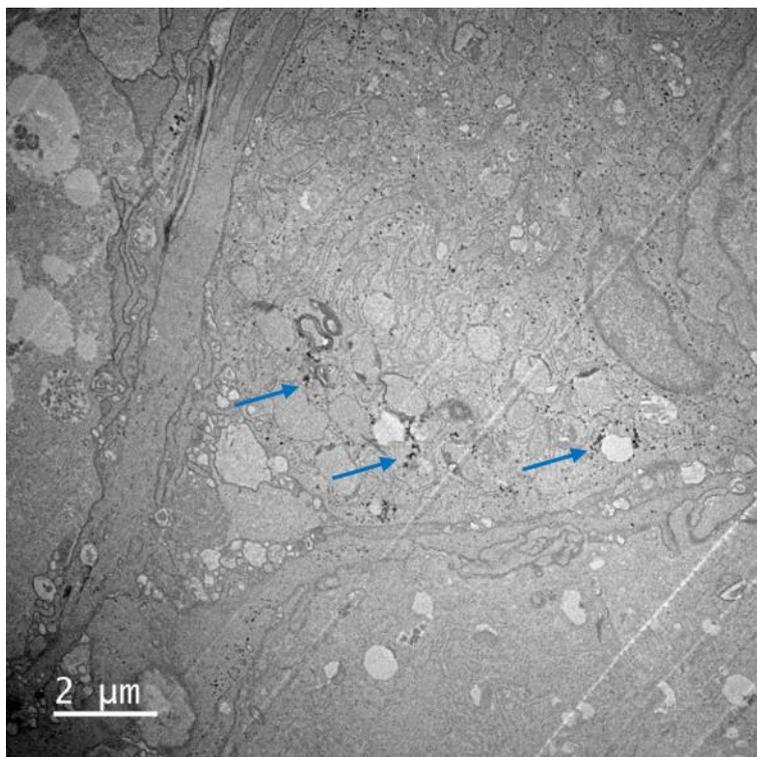


Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides expostos a nCHA. Os esferoides foram expostos a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nCHA na monocamada. Para a MET, os esferoides foram cortados e as setas azuis indicam a presença da nCHA.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho integra um projeto pertencente à Rede Nanosaúde, uma rede multidisciplinar de pesquisadores em nanotecnologia de 32 laboratórios no Rio de Janeiro, incluindo a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Os resultados referentes à Hidroxiapatita Carbonatada Nanoestruturada (nCHA) dão continuidade a uma série de ensaios *in vitro*, *in vivo* e clínicos da rede de Bioengenharia de Estado do Rio de Janeiro, compreendendo o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa (INCT/Regenera). A rede tem como um dos seus focos o desenvolvimento de materiais que promovam a regeneração e substituição óssea. Dentre eles, a nCHA tem sido uma das soluções encontradas para acelerar a recuperação clínica de pacientes com perdas ósseas irreversíveis. Esse material possui custos bem inferiores aos similares disponíveis comercialmente no Brasil. O registro da patente foi encaminhado e, em seguida, deverá ser feito o pedido de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para que a produção e comercialização em larga escala seja iniciada. Os testes de citotoxicidade em modelos tridimensionais, desenvolvidos no presente trabalho, são requisitos para o registro.

Os testes citotóxicos *in vitro* abordados nesse trabalho seguem as normas vigentes da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), que compila os métodos alternativos ao uso de animais que foram reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aceitos pela Anvisa. As diretrizes foram dispostas no compêndio “Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil”, utilizado como guia para a execução experimental.

O teste guia nº 129 da OECD apresenta orientações sobre “Uso de Testes de Citotoxicidade para Estimar Doses Iniciais para Testes Agudos de Toxicidade Sistêmica Oral”. A toxicidade sistêmica aguda avalia os efeitos adversos que ocorrem após a exposição de organismos a uma ou múltiplas doses de uma substância teste.

A intensificação das demandas para abordar o conceito dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição do uso de animais em pesquisa) introduzido por Russel e Burch (RUSSEL e BURCH, 1959) impulsionou novas estratégias de triagem na pesquisa científica. A redução do número de animais tem muitas implicações, como impacto econômico e social. Para tanto, foram criados comitês internacionais e nacionais para organizar a validação de métodos alternativos. Exemplos de tais comitês incluem o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) na Europa, o Comitê de Coordenação Interinstitucional sobre a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) nos Estados Unidos (STOKES, 2002) e o Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) no Brasil (ESKES *et al.*, 2009).

No entanto, apesar do surgimento de modelos mais relevantes para os seres humanos e baseados em vias moleculares e celulares (BURDEN *et al.*, 2015; KLEENSANG, 2014; MEEK *et al.*, 2013; KREWSKI *et al.*, 2010; ANKLEY *et al.*, 2010) o progresso de métodos alternativos para uso regulatório tem sido lento (HAMM *et al.*, 2017; SEWELL *et al.*, 2017). Com exceção do regulamento de produtos cosméticos em que os testes em animais foram proibidos, os testes regulamentares e de segurança ainda dependem de testes em animais. Além dos aspectos éticos, as limitações em extrapolar dados animais para efeitos humanos têm sido amplamente discutidas, especialmente em termos de reprodutibilidade e no que tange a relevância (HARTUNG, 2008; HOFFMANN *et al.*, 2010). Assim, 17 métodos alternativos *in vitro* foram validados e adotados no Brasil. Dentre esses, foi reconhecido o uso do teste de citotoxicidade *in vitro* para estimar as doses iniciais para toxicidade sistêmica oral aguda, usando linhagens celulares BALB /3T3 A1 (fibroblasto murino) ou NHK (queratinócitos humanos normais) como os testes guias da OECD (KANDÁROVÁ e LETALIOVÁ, 2011), principalmente os voltados para testes de toxicidade sistêmica (toxicidade aguda, carcinogenicidade, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva e toxicidade de dose repetida).

Um desses testes consiste no ensaio de captação de vermelho neutro (NRU) (OECD, 2010). Entretanto, uma preocupação especial é com a baixa correlação entre os dados *in vitro*, que são expressos por IC50 e os dados *in vivo*, que são expressos por LD50. O teste IC50 se refere à medida quantitativa que indica quanto de uma substância é necessário para inibir um dado processo biológico pela metade, ao passo que, a DL50 consiste em um teste para avaliar a toxicidade *in vivo*. Esta correlação foi

previamente estabelecida pelo Registro de Citotoxicidade (HALLE, 2003) e foi complementada pelo ICCVAM (ICCVAM e 2006a, ICCVAM e 2006b) para obter uma previsão de LD50 mais confiável não apenas para substâncias puras, mas também para misturas (ICCVAM e 2006b).

Estudos de validação multilaboratorial baseado em NRU em fibroblastos de camundongo (BALB /3T3 A1) e queratinócitos epidérmicos humanos normais (NHK) com 72 substâncias de referência mostraram uma correlação entre os dados de concentração inibitória (IC50) e dose letal (LD50). Os resultados dos testes de toxicidade aguda atuam como um guia na seleção da dosagem para estudos de toxicidade de longo prazo (ERHIRHIE *et al.*, 2018).

O ensaio de vermelho neutro é um ensaio de viabilidade celular sensível e facilmente quantificável e preciso em uma ampla faixa de pH, no contexto de morte celular apoptótica ou autofágica. Seu uso permite uma avaliação mais precisa da citotoxicidade de agentes quimioterápicos em condições ácidas, como as do microambiente tumoral. Ao contrário do que ocorre no ensaio MTT, ainda muito utilizado em testes toxicológicos, pois, embora o MTT geralmente funcione bem em condições fisiológicas, ele não é adequado para culturas ácidas, como em células tumorais (GOMEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2020). Dessa forma, culturas ácidas diminuem a precisão do ensaio MTT, porque o pH ácido afeta negativamente a produção de formazan (JOHNO *et al.* 2010). Em vista disso, o ensaio NRU se mostra pertinente frente a demais testes disponíveis, em monocamada.

Como mencionado anteriormente, as células BALB /3T3 A1 e NHKs são amplamente aceitas como modelo de cultura celular para o ensaio de captação de vermelho neutro para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda e existe correlação entre IC50 e LD 50 (ICCVAM e 2006a, ICCVAM e 2006b, ICCVAM e 2006c, ICCVAM e 2006d, ICCVAM e 2006e). Como o principal modelo celular utilizado nos ensaios de citotoxicidade são as culturas de células primárias e as cepas transformadas, cada um apresenta vantagens e desvantagens. As desvantagens estão relacionadas principalmente ao alto custo e variabilidade das culturas primárias e instabilidade genética ou resposta fisiológica das cepas transformadas. Adicionalmente, espera-se que estes modelos celulares sejam utilizados para a previsão de toxicidade em modelos animais e não para a previsão de toxicidade em humanos, visto que não há metodologia validada *in vitro* com essa finalidade.

As células-tronco desempenham um papel importante na medicina regenerativa devido às suas propriedades de autorrenovação e potencial de diferenciação em diversos tipos celulares (NAVA *et al.*, 2012). Esses processos de autorrenovação e diferenciação são interessantes para ensaios de citotoxicidade (HOOK, 2012, KANG e TROSKO, 2011), por conseguinte, tornam as células-tronco um bom modelo para prever a toxicidade por poderem ser aplicadas para avaliação dos efeitos citotóxicos na viabilidade celular, bem como em processo de diferenciação celular (HOOK, 2012, LUTTUN e VERFAILLIE, 2005), e possivelmente mais relevantes para a previsão de toxicidade humana. Além disso, elas representam um modelo *in vitro* bem estabelecido para a população de células multipotentes humanas, além de não requerem tantos suplementos quanto a NHK.

Embora as células-tronco adultas tenham uma autorrenovação mais limitada e um potencial de diferenciação mais restrito comparado às células-tronco pluripotentes (HOOK, 2012, LUTTUN e VERFAILLIE, 2005), elas têm a vantagem de relevância fisiológica, disponibilidade alta e acessível, reprodutibilidade e escalabilidade para previsão de toxicidade (HOOK, 2012). As células-tronco mesenquimais da medula óssea foram avaliadas como um bom modelo de cultura de células para a previsão de toxicidade pela captação de vermelho neutro em comparação com NHKs e fibroblastos BALB /3T3 A1 murinos (SCANU *et al.*, 2011).

Apesar desses resultados serem promissores, as células-tronco derivadas da medula óssea não são tão facilmente obtidas, portanto, outras fontes de células-tronco multipotentes devem ser avaliadas para ensaios de citotoxicidade. Há escassos relatos sobre o uso de células-tronco/estromais derivadas do tecido adiposo (ASC) para avaliação toxicológica por uma metodologia validada. Essa população celular é prontamente obtida a partir de lipoaspirados e disseções de tecido adiposo subcutâneo que é desprezado em cirurgias plásticas. Representando, dessa forma, uma fonte disponível para o isolamento de células-tronco (GIMBLE *et al.*, 2007).

Comercialmente, a empresa HUB Organoids (HUB) tem empregado estruturas 3D como modelo pré clínico para medicamentos anticâncer. Ensaios clínicos da empresa demonstraram que adaptar o tratamento anticâncer às características moleculares e patológicas do tumor melhora a sobrevivência dos pacientes. Convencionalmente, utiliza-se linhagens celulares imortalizadas, no entanto, elas não têm relevância fisiológica e congruência genética com o tumor original do paciente.

Assim, eles utilizaram estruturas tridimensionais, como organoides, derivados de ressecções ou biópsias de tecidos de pacientes como modelos para triagem *in vitro* de toxicidade e desenvolvimento de drogas. Esses modelos se mostraram clinicamente mais relevantes do que as linhagens de células padrão, devido a sua capacidade de recapitular fielmente as características fenotípicas e genotípicas do tumor do paciente, incluindo mutações (GOTO; YILMAZ, 2022). Tais características reduzem a triagem de fármacos para 5 anos, culminando em economia financeira e avanço na medicina de precisão.

Por conseguinte, propusemos aqui avaliar as ASCs em protocolos validados de citotoxicidade. Para a BALB /3T3 A1, o guia nº 129 adota a densidade celular em monocamada de 3×10^3 por poço, para que no momento da leitura, a densidade óptica (DO) dos controles negativos seja $\geq 0,30$. No presente trabalho, a densidade celular teve que ser ajustada para adequação da DO exigida. Assim, a densidade celular de ASCs adequada encontrada foi de 2×10^4 células por poço. Abud e colaboradores compararam o ensaio de NRU entre ASC e BALB /3T3 A1 para 12 substâncias de referência, dentre elas o SDS, e obtiveram um valor de $IC_{50_{ASC}}$ de $70,7 \mu\text{g/mL}$, indicando que essas células são mais resistentes que a BALB /3T3 A1 para a substância testada (ABUD *et al.*, 2015). Esses dados corroboram com nossos achados, uma vez que encontramos um valor de $IC_{50_{ASC}}$ de $77 \mu\text{g/mL}$.

Outra vantagem em aplicar essas células é a possibilidade de analisar o mecanismo de ação de um fármaco nas próprias células do paciente, fornecendo modelos humanos para estudar a patologia da doença em origens genéticas distintas e a resposta aos fármacos durante seu desenvolvimento (BELLIN *et al.*, 2012). Até o presente momento, existe uma metodologia validada pelo Comitê Europeu para a Validação de Métodos Alternativos que emprega células-tronco embrionárias murinas em um sistema de co-cultivo com células BALB /3T3 A1 para avaliar embriotoxicidade. Todavia, apenas esse teste não é suficiente para regulamentação, apesar de conter alta previsão (ECVAM, 2010), além disso, utilizam células murinas, podendo não refletir de forma assertiva a toxicidade humana. Dessa forma, estão sendo desenvolvidos ensaios com células-tronco embrionárias humanas (BEHAR *et al.*, 2012; RAJAMOHAN *et al.*, 2013; COLEMAN, 2014).

Os testes toxicológicos são realizados para identificar potenciais efeitos adversos que um produto químico, material ou nanopartícula, possa representar para

um indivíduo e seu ambiente circundante (HARTUNG, 2009). Progressos recentes na toxicologia *in vitro* levaram ao desenvolvimento de modelos mais semelhantes à complexidade de órgãos e tecidos, tanto em termos de estrutura quanto de funcionalidade, caracterizados por desfechos mais precisos (BARTFELD e CLEVERS, 2017; PAMIES *et al.*, 2018; TRUSKEY, 2018). Hoje é bem aceito que o cultivo de células em sistemas tridimensionais (3D) que mimetizam fatores-chave do tecido é muito mais representativo do ambiente *in vivo* do que monocamadas bidimensionais (2D) (LANGHANS, 2018; PAMPALONI *et al.*, 2007; RAVI *et al.*, 2015). Um dos modelos 3D mais interessantes são os esferoides, uma vez que podem fornecer uma abordagem muito versátil para triagem de alto rendimento (*HTS*, do inglês *High-Throughput-Screening*) de medicamentos e mostram potencial para serem usados convencionalmente em estudos farmacêuticos (URICH *et al.*, 2013; CHO *et al.*, 2017; BOUTIN *et al.*, 2018). Eles podem ser facilmente reproduzidos em larga escala devido à relativa facilidade de cultura e reprodutibilidade assim como produzidos de forma automatizada (SEO *et al.*, 2020; REZENDE *et al.*, 2013).

O uso de grânulos ou nanopartículas para uso clínico já foi proposto anteriormente (MITRI *et al.*, 2012; LOMELINO *et al.*, 2011), pois podem simular um ambiente poroso para aumento da osteocondutividade. Nesse contexto, nanopartículas de hidroxiapatita carbonatadas podem ser promissoras para substituição óssea. Baseado nos resultados citotóxicos adaptados nesse estudo, a hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada não afetou a integridade da membrana, atestado por NRU, e não apresentou atividade citotóxica em nenhuma concentração abordada.

Os métodos de cultura de células 3D possuem potencial de alcançar respostas que ainda não foram elucidadas através do uso de técnicas de cultivo 2D. Com a nova tecnologia, no entanto, surgem obstáculos e desafios. Embora vantajosa em muitos aspectos em relação às culturas 2D, a cultura 3D tende a ser mais cara e pode ser difícil replicar microambientes celulares ao usar certos métodos de cultivo (LANGHANS, 2018).

A aquisição de imagens se torna difícil quando grandes *scaffolds* são usados (ANTONI *et al.*, 2015). Culturas dependentes de ancoragem, como placas suspensas, podem ser muito difíceis de visualizar devido à incompatibilidade da placa com microscópios e esferoides descentralizados nos poços das placas de cultivo (BOOIJ

et al., 2019). A microscopia de fluorescência ainda é um desafio em culturas de células 3D pois, ao contrário da cultura de células 2D, onde apenas uma única imagem xy é obtida, as culturas de células 3D devem obter um “z stack” tirando uma série de imagens xy em intervalos fixos na direção vertical por microscópios automatizados (BOOIJ *et al.*, 2019). Ter que tirar uma série de imagens xy para obter um “z stack” geralmente aumenta o tempo de processamento significativamente e não são práticas para análises de alto rendimento, pois consome muito tempo e espaço de armazenamento (BOOIJ *et al.*, 2019).

A medição do teor de ATP citoplasmático é um método comum para determinação da viabilidade celular em cultura de células 2D e 3D e é um *endpoint* de rotina em estudos de toxicologia/eficácia de drogas. Inicialmente, a arquitetura dos agregados celulares 3D, como tamanho, composição e barreira de penetração, apresentou um desafio para ensaios originalmente adaptados para os modelos de cultura de células 2D, pois a estrutura 3D oferece um obstáculo adicional para lise eficaz e acessibilidade de reagentes. No entanto, pela otimização da composição do detergente e das condições de lise, foram desenvolvidos ensaios de ATP adequados para formatos variáveis de cultura de células 3D (como esferoides e sistemas à base de hidrogel) (IDREES *et al.*, 2018).

O ensaio primário frequentemente escolhido para determinação da viabilidade de cultura de células 3D é a quantificação de um sinal luminescente gerado pela conversão de luciferina por luciferase em função da concentração de ATP citoplasmático (RIMANN *et al.*, 2014). O ensaio de detecção de ATP bioluminescente disponível é robusto, sensível e escalonável para ensaios de alto rendimento e oferece fluxo de trabalho e análise de dados relativamente simples. Em contraste, métodos colorimétricos padrão baseados em redução de resazurina (ensaio de azul de Alamar) ou redução de tetrazólio (ensaio de MTT), frequentemente usados para avaliar o número de células viáveis em cultura de células 2D, não se aplicam a esferoides/microtecidos 3D e matrizes de colágeno, pois podem afetar a absorção e a cinética de difusão de um corante, portanto, alterando a leitura do ensaio e tornando os resultados mais difíceis de interpretar (WALZL *et al.*, 2014). Kits de ensaio prontos para uso, como *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay*, facilitam o processamento padronizado e com eficiência de tempo de várias placas de ensaio, combinando lise e geração de sinal luminescente em uma única etapa.

A liberação de lactato desidrogenase (LDH) é frequentemente usada como *endpoint* para estudos de citotoxicidade pois a perda da integridade da membrana pode ser avaliada monitorando a atividade da LDH no meio. No entanto, nem todos os ensaios utilizados em 2D podem ser prontamente aplicados para cultivos 3D. Diversos produtos químicos inativam a atividade da enzima LDH ou interferem na capacidade celular de liberar LDH (KENDIG e TARLOFF, 2007). Zheng e colaboradores demonstraram que ocorre inativação e alterações conformacionais da lactato desidrogenase em soluções de dodecil sulfato de sódio (SDS), em que o aumento da concentração de SDS levou a uma inibição rápida e dependente da concentração da enzima, com inativação completa em 5 min (ZHENG *et al.*, 2002). Esses resultados podem elucidar a falta de adequação da medição de LDH nos esferoides no presente estudo.

Apesar das limitações atualmente enfrentadas pelos métodos de cultivo de células 3D, uma pesquisa das tecnologias de alto rendimento demonstrou que dois terços dos pesquisadores têm intenção de mudar do cultivo 2D para 3D (ANTONI *et al.*, 2015). Dessa forma, quanto mais pesquisadores adotarem o cultivo 3D, o desenvolvimento de novas metodologias que superam as limitações atuais será mais ágil.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, o uso de células-tronco/estromais derivadas do tecido adiposo humano (ASC) foi avaliado para previsão de toxicidade aplicando um protocolo validado (OCDE, 2010; ICCVAM e 2006c). Nossos resultados sugerem que ASC pode ser usado como um novo modelo de cultura de células para prever doses iniciais em ensaios de toxicidade aguda.

Ademais, foi configurado um modelo tridimensional de esferoides baseado em células-tronco humanas para testes toxicológicos e sua funcionalidade foi atestada com a hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada, cuja literatura já apontava sua biocompatibilidade. Para a plena validação do modelo padronizado nesse estudo novas nanopartículas devem ser testadas. No entanto, fornecemos evidências de que é exequível a produção de um modelo *in vitro* para testes toxicológicos tridimensional.

7 REFERÊNCIAS

ABAGNALE, Giulio; STEGER, Michael; NGUYEN, Vu Hoa; HERSCH, Nils; SECHI, Antonio; JOUSSEN, Sylvia; DENECKE, Bernd; MERKEL, Rudolf; HOFFMANN, Bernd; DRESER, Alice. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials*, [S.L.], v. 61, p. 316-326, ago. 2015.

ABDOLMOHAMMADI, Kamal; PAKDEL, Fatemeh Dadgar; AGHAEI, Hamideh; ASSADIASL, Sara; FATAHI, Yousef; ROUZBAHANI, Negin Hosseini; REZAIEMANESH, Alireza; SOLEIMANI, Masoud; TAYEBI, Lobat; NICKNAM, Mohammad Hossein. Ankylosing spondylitis and mesenchymal stromal/stem cell therapy: a new therapeutic approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [S.L.], v. 109, p. 1196-1205, jan. 2019.

ABUD, Ana Paula Ressetti; ZYCH, Jaiesa; REUS, Thamile Luciane; KULIGOVSKI, Crisciele; MORAES, Elizabeth de; DALLAGIOVANNA, Bruno; AGUIAR, Alessandra Melo de. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, [S.L.], v. 73, n. 3, p. 992-998, dez. 2015.

AMARAL, Jônatas Bussador do; REZENDE-TEIXEIRA, Paula; FREITAS, Vanessa Morais; MANCHADO-SANTELLI, Gláucia Maria. MCF-7 Cells as a Three-Dimensional Model for the Study of Human Breast Cancer. *Tissue Engineering Part C: Methods*, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 1097-1107, nov. 2011.

ANDERSEN, Therese; AUK-EMBLEM, Pia; DORNISH, MinCHAEI. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays*, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 133-161, 24 mar. 2015.

ANDRZEJEWSKA, Anna; LUKOMSKA, Barbara; JANOWSKI, Mirosław. Concise Review: mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, [S.L.], v. 37, n. 7, p. 855-864, 30 abr. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/stem.3016>.

ANKLEY, Gerald T.; BENNETT, Richard S.; ERICKSON, Russell J.; HOFF, Dale J.; HORNUNG, Michael W.; JOHNSON, Rodney D.; MOUNT, David R.; NICHOLS, John W.; RUSSOM, Christine L.; SCHMIEDER, Patricia K.. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 730-741, mar. 2010.

ANTONI, Delphine; BURCKEL, Hélène; JOSSET, Elodie; NOEL, Georges. Three-Dimensional Cell Culture: a breakthrough in vivo. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 5517-5527, 11 mar. 2015.

ARROWSMITH, John; MILLER, Philip. Phase II and Phase III attrition rates 2011–2012. *Nature Reviews Drug Discovery*, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 569-569, ago. 2013.

BAE, Keum Seok; PARK, Joon Beom; KIM, Hyun Soo; KIM, Dae Sung; PARK, Dong Jun; KANG, Seong Joon. Neuron-Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Yonsei Medical Journal*, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 401, 2011.

BAKER, Brendon M.; CHEN, Christopher S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal Of Cell Science*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 3015-3024, 1 jan. 2012.

BAPTISTA, L., DO AMARAL, R., CARIAS, R., ANICETO, M., CLAUDIO-DA-SILVA, C., BOROJEVIC, R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy*, v. 11, p. 706-715, 2009.

BAPTISTA, L.S., PEDROSA, C.G.S., SILVA K.R., OTAZ  , I.B., TAKYIA, C.M., DUTRA, H.S., CLÁUDIO-DA-SILVA, C., BOROJEVIC, R., ROSSI, M.I.D. Bone Marrow and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: How Close Are They? *Journal of Stem Cells*, v.2, 2007.

BAPTISTA, Leandra S.; AMARAL, Ronaldo J. F. C do; CARIAS, Rosana B.V.; ANICETO, Marcelo; CLAUDIO-DA-SILVA, Cesar; BOROJEVIC, Radovan. An

alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy*, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 706-715, jan. 2009.

BARTFELD, Sina; CLEVERS, Hans. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *Journal Of Molecular Medicine*, [S.L.], v. 95, n. 7, p. 729-738, 8 abr. 2017.

BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patries M.; TAN, An S.. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, [S.L.], p. 127-152, 2005.

BIRGERSDOTTER, Anna; SANDBERG, Rickard; ERNBERG, Ingemar. Gene expression perturbation *in vitro*—A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars In Cancer Biology*, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 405-412, out. 2005.

BISSELL, Mina J; RIZKI, Aylin; MIAN, I Saira. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current Opinion In Cell Biology*, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 753-762, dez. 2003.

BOBYLEVA, Polina *et al.* Reciprocal modulation of cell functions upon direct interaction of adipose mesenchymal stromal and activated immune cells. *Cell Biochemistry And Function*, [s.l.], p.1-13, abr. 2019.

BOURIN P, BUNNELL B, CASTEILLA L, DOMINICI M, KATZ A, MARCH K, REDL H, RUBIN J, YOSHIMURA K, GIMBLE J. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society. *Cytotherapy*, v. 15, p. 641–648, 2013.

BOUTIN, Molly E.; KRAMER, Liana L.; LIVI, Liane L.; BROWN, Tyler; MOORE, Christopher; HOFFMAN-KIM, Diane. A three-dimensional neural spheroid model for capillary-like network formation. *Journal Of Neuroscience Methods*, [S.L.], v. 299, p. 55-63, abr. 2018.

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

BURDEN, Natalie; SEWELL, Fiona; ANDERSEN, Melvin E.; BOOBIS, Alan; CHIPMAN, J. Kevin; CRONIN, Mark T. D.; HUTCHINSON, Thomas H.; KIMBER, Ian; WHELAN, Maurice. Adverse Outcome Pathways can drive non-animal approaches for safety assessment. *Journal Of Applied Toxicology*, [S.L.], v. 35, n. 9, p. 971-975, 5 maio 2015.

CABALLERO, David; VOITURIEZ, Raphaël; RIVELINE, Daniel. The cell ratchet: interplay between efficient protrusions and adhesion determines cell motion. *Cell Adhesion & Migration*, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 327-334, 27 ago. 2015.

CALASANS-MAIA, Mônica Diuana; BARBOZA JUNIOR, Carlos Alberto Brazil; SORIANO-SOUZA, Carlos Alberto; ALVES, Adriana Terezinha Neves Novellino; UZEDA, Marcelo Jose de Pinheiro; MARTÍNEZ-ZELAYA, Victor R; MAVROPOULOS, Elena; LEÃO, Maria Helena Rocha; SANTANA, Ronaldo Barcellos de; GRANJEIRO, Jose Mauro. Microspheres of alginate encapsulated minocycline-loaded nanocrystalline carbonated hydroxyapatite: therapeutic potential and effects on bone regeneration. *International Journal Of Nanomedicine*, [S.L.], v. 14, p. 4559-4571, jun. 2019.

CALASANS-MAIA, Mônica Diuana; MELO, Bruno Raposo de; ALVES, Adriana Terezinha Neves Novellino; RESENDE, Rodrigo Figueiredo de Brito; LOURO, Rafael Seabra; SARTORETTO, Suelen Cristina; GRANJEIRO, José Mauro; ALVES, Gutemberg Gomes. Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair. *Journal Of Applied Oral Science*, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 599-608, dez. 2015.

CARMO, André Boziki Xavier do; SARTORETTO, Suelen Cristina; ALVES, Adriana Terezinha Neves Novellino; GRANJEIRO, José Mauro; MIGUEL, Fúlvio Borges;

CALASANS-MAIA, Jose; CALASANS-MAIA, Monica Diuana. Alveolar bone repair with strontium- containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. *Journal Of Applied Oral Science*, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 3015-3024, 18 jan. 2018.

CAWKILL, Darren; EAGLESTONE, Simon S.. Evolution of cell-based reagent provision. *Drug Discovery Today*, [S.L.], v. 12, n. 19-20, p. 820-825, out. 2007.

CENTENO, Eduarda G Z; CIMAROSTI, Helena; BITHELL, Angela. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular Neurodegeneration*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 13-27, 22 maio 2018.

CHANG, Chun-Jung; YEN, Men-Luh; CHEN, Yao-NCHAng; CHIEN, Chih-Cheng; HUANG, Hsing-I.; BAI, Chyi-Huey; YEN, B. Linju. Placenta-Derived Multipotent Cells Exhibit Immunosuppressive Properties That Are Enhanced in the Presence of Interferon- γ . *Stem Cells*, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 2466-2477, nov. 2006.

CHEN, Su-Feng; CHANG, Yun-Ching; NIEH, Shin; LIU, Chia-Lin; YANG, Chin-Yuh; LIN, Yaoh-Shiang. Nonadhesive Culture System as a Model of Rapid Sphere Formation with Cancer Stem Cell Properties. *Plos One*, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 31864-31885, 16 fev. 2012.

CHIU, Chih-Hao; CHEN, Poyu; CHEN, Alvin Chao-Yu; CHAN, Yi-Sheng; HSU, Kuo-Yao; REI, Higashikawa; LEI, Kin Fong. Real-Time Monitoring of Ascorbic Acid-Mediated Reduction of Cytotoxic Effects of Analgesics and NSAIDs on Tenocytes Proliferation. *Dose-Response*, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 155932581983214, jan. 2019.

CHO, Choi-Fong; WOLFE, Justin M.; FADZEN, Colin M.; CALLIGARIS, David; HORNBURG, Kalvis; CHIOCCA, E. Antonio; AGAR, Nathalie Y. R.; PENDELUTE, Bradley L.; LAWLER, Sean E.. Blood-brain-barrier spheroids as an *in vitro* screening platform for brain-penetrating agents. *Nature Communications*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 910-919, 6 jun. 2017.

CHOUDHERY, Mahmood Saba; BADOWSKI, MinCHAE; MUISE, Angela; HARRIS, David T. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytotherapy*, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 330-343, mar. 2013.

CHUNG, Cheng-Shu; FUJITA, Naoki; KAWAHARA, Naoya; YUI, Sho; NAM, Eunryel; NISHIMURA, Ryohei. A Comparison of Neurosphere Differentiation Potential of Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal Of Veterinary Medical Science*, [S.L.], v. 75, n. 7, p. 879-886, 2013.

CLEVERS, Hans. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, [S.L.], v. 165, n. 7, p. 1586-1597, jun. 2016.

COSTA, Elisabete C.; MOREIRA, André F.; MELO-DIOGO, Duarte de; GASPAR, Vítor M.; CARVALHO, Marco P.; CORREIA, Ilídio J. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 1427-1441, dez. 2016.

DEBNATH, Jayanta; BRUGGE, Joan S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature Reviews Cancer*, [S.L.], v. 5, n. 9, p. 675-688, set. 2005.

DECARLI, Monize Caiado; AMARAL, Robson Luis Ferraz do; SANTOS, Diogo Peres dos; TOFANI, Larissa Bueno; KATAYAMA, Eric; REZENDE, Rodrigo Alvarenga; SILVA, Jorge Vicente Lopes da; SWIECH, Kamilla; SUAZO, Cláudio Alberto Torres; MOTA, Carlos. Cell spheroids as a versatile research platform: formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. *Biofabrication*, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 50-62, 16 fev. 2021.

DHALIWAL, Anandika. Three Dimensional Cell Culture: a review. *Materials And Methods*, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 3019-3028, 26 dez. 2012.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, DJ., HORWITZ, E. Minimal

criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, v. 8, p. 315-317, 2006.

DOROZHKIN, Sergey V. Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical applications. *Ceramics International*, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 6529-6554, maio 2016.

EL-SERAFI, Ahmed Taher. Epigenetic Modifiers and Stem Cell Differentiation. *Stem Cells And Cancer Stem Cells*, Volume 8, [S.L.], p. 147-154, 2012.

ENGLER, Adam J.; SEN, Shamik; SWEENEY, H. Lee; DISCHER, Dennis E.. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, [S.L.], v. 126, n. 4, p. 677-689, ago. 2006.

ERHIRHIE, Earnest Oghenesuvwe; IHEKWEREME, Chibueze Peter; ILODIGWE, Emmanuel Emeka. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology*, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 5-12, 1 maio 2018.

ESKES, Chantra. Proposal for a Brazilian centre on alternative test methods. *Altex*, [S.L.], p. 303-306, 2009.

FERREIRA, L.P.; GASPAR, V.M.; MANO, J.F. Design of spherically structured 3D *in vitro* tumor models -Advances and prospects. *Acta Biomaterialia*, [S.L.], v. 75, p. 11-34, jul. 2018.

FILIPOWSKA, Joanna; TOMASZEWSKI, Krzysztof A.; NIEDWIEDZKI, ukasz; WALONCHA, Jerzy A.; NIEDWIEDZKI, Tadeusz. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 291-302, 13 fev. 2017.

FISCHBACH, Claudia; CHEN, Ruth; MATSUMOTO, Takuya; SCHMELZLE, Tobias; BRUGGE, Joan s; POLVERINI, Peter J; MOONEY, David J. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nature Methods*, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 855-860, 2 set. 2007.

FRIEBOES, Hermann B.; ZHENG, Xiaoming; SUN, Chung-Ho; TROMBERG, Bruce; GATENBY, Robert; CRISTINI, Vittorio. An Integrated Computational/Experimental Model of Tumor Invasion. *Cancer Research*, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 1597-1604, 1 fev. 2006.

FURGER C. John WILEY & SONS; HOBOKEN, New Jersey, USA: 2016. *Live Cell Assays, from Research to Health and Regulatory Applications*. 2016.

FUSTER, José J.; OUCHI, Noriyuki; GOKCE, Noyan; WALSH, Kenneth. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, [S.L.], v. 118, n. 11, p. 1786-1807, 27 maio 2016.

GILBERT, P. M.; HAVENSTRITE, K. L.; MAGNUSSON, K. E. G.; SACCO, A.; LEONARDI, N. A.; KRAFT, P.; NGUYEN, N. K.; THRUN, S.; LUTOLF, M. P.; BLAU, H. M.. Substrate Elasticity Regulates Skeletal Muscle Stem Cell Self-Renewal in Culture. *Science*, [S.L.], v. 329, n. 5995, p. 1078-1081, 27 ago. 2010.

GOMEZ-GUTIERREZ, Jorge G.; BHUTIANI, Neal; MCNALLY, Molly W.; CHUONG, Phillip; YIN, Wenyuan; JONES, Meredith A.; ZEIDERMAN, Matthew R.; GRIZZLE, William E.; MCNALLY, Lacey R.. The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment *in vitro*. *Biotechnic & Histochemistry*, [S.L.], v. 96, n. 4, p. 302-310, 3 ago. 2020.

GOODMAN, Thomas Tyrel; NG, Chee Ping; PUN, Suzie Hwang. 3-D Tissue Culture Systems for the Evaluation and Optimization of Nanoparticle-Based Drug Carriers. *Bioconjugate Chemistry*, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 1951-1959, 13 set. 2008.

GOTO, Norihiro; YILMAZ, Ömer H.. Bispecific antibodies seek out colon cancer stem cells. *Nature Cancer*, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 379-380, abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

GRADO, Gabriel Fernandez de; KELLER, Laetitia; IDOUX-GILLET, Ysia; WAGNER, Quentin; MUSSET, Anne-Marie; BENKIRANE-JESSEL, Nadia; BORNERT, Fabien; OFFNER, Damien. Bone substitutes: a review of their Characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal Of Tissue Engineering*, [S.L.], v. 9, p. 204173141877681, 1 jan. 2018.

GRIFFITH, Linda G.; SWARTZ, Melody A. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 211-224, mar. 2006.

H.S., CLÁUDIO-DA-SILVA, C., BOROJEVIC, R., ROSSI, M.I.D. Bone Marrow and HAISLER, William L; TIMM, David M; A GAGE, Jacob; TSENG, Hubert; KILLIAN, T C; SOUZA, Glauco R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nature Protocols*, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 1940-1949, 12 set. 2013.

HABIBOVIC, Pamela; JUHL, Maria V.; CLYENS, Stuart; MARTINETTI, Roberta; DOLCINI, Laura; THEILGAARD, Naseem; VAN BLITTERSWIJK, Clemens A.. Comparison of two carbonated apatite ceramics *in vivo*. *Acta Biomaterialia*, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 2219-2226, jun. 2010.

HABRAKEN, Wouter; HABIBOVIC, Pamela; EPPLE, Matthias; BOHNER, Marc. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today*, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 69-87, mar. 2016.

HAMM, Jon; SULLIVAN, Kristie; CLIPPINGER, Amy J.; STRICKLAND, Judy; BELL, Shannon; BHHATARAI, Barun; BLAAUBOER, Bas; CASEY, Warren; DORMAN, David; FORSBY, Anna. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: moving from research to regulatory testing. *Toxicology in vitro*, [S.L.], v. 41, p. 245-259, jun. 2017.

HARTUNG, Thomas. Food for thought...on animal tests. *Altex*, [S.L.], p. 3-9, 2008.

HARTUNG, Thomas. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*, [S.L.], v. 460, n. 7252, p. 208-212, jul. 2009.

HELLMUND, Katharina S.; KOKSCH, Beate. Self-Assembling Peptides as Extracellular Matrix Mimics to Influence Stem Cell's Fate. *Frontiers In Chemistry*, [S.L.], v. 7, p. 3015-3024, 27 mar. 2019.

HICKMAN, John A.; GRAESER, Ralph; HOOGT, Ronald de; VIDIC, Suzana; BRITO, Catarina; GUTEKUNST, Matthias; KUIP, Heiko van Der; CONSORTIUM, Imi Prelect. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity *in vitro/ex vivo*. *Biotechnology Journal*, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 1115-1128, set. 2014.

HOFFMANN, Sebastian; KINSNER-OVASKAINEN, Agnieszka; PRIETO, Pilar; MANGELSDORF, Inge; BIELER, Christian; COLE, Thomas. Acute oral toxicity: variability, reliability, relevance and interspecies comparison of rodent Id50 data from literature surveyed for the acutetox project. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 395-407, dez. 2010.

HONGISTO, Vesa; JERNSTRÖM, Sandra; FEY, Vidal; MPINDI, John-Patrick; SAHLBERG, Kristine Kleivi; KALLIONIEMI, Olli; PERÄLÄ, Merja. High-Throughput 3D Screening Reveals Differences in Drug Sensitivities between Culture Models of JIMT1 Breast Cancer Cells. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 77232-77240, 23 out. 2013.

HOOK, Lilian A. Stem cell technology for drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, [S.L.], v. 17, n. 7-8, p. 336-342, abr. 2012.

HOU, Lingling; CAO, Hua; WANG, Dongmei; WEI, Guorong; BAI, Cixian; ZHANG, Yong; PEI, Xuetao. Induction of Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells *in vitro*. *International Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 256-261, out. 2003.

HOU, Lingling; CAO, Hua; WANG, Dongmei; WEI, Guorong; BAI, Cixian; ZHANG, Yong; PEI, Xuetao. Induction of Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells *in vitro*. *International Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 256-261, out. 2003.

HUANG, Hongzhou; DING, Ying; SUN, Xiuzhi S.; NGUYEN, Thu A.. Peptide Hydrogelation and Cell Encapsulation for 3D Culture of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 59482-59490, 20 mar. 2013.

IDREES, Ayesha; CHIONO, Valeria; CIARDELLI, Gianluca; SHAH, Siegfried; VIEBAHN, RinCHArD; ZHANG, Xiang; SALBER, Jochen. Validation of *in vitro* assays in three-dimensional human dermal constructs. *The International Journal Of Artificial Organs*, [S.L.], v. 41, n. 11, p. 779-788, 29 maio 2018.

JACKSON, E. L.; LU, H.. Three-dimensional models for studying development and disease: moving on from organisms to organs-on-a-chip and organoids. *Integrative Biology*, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 672-683, 2016.

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers In Molecular Biosciences*, [S.L.], v. 7, n. 33, p. 3015-3024, 6 mar. 2020.

JIN, Hye; BAE, Yun; KIM, Miyeon; KWON, Soon-Jae; JEON, Hong; CHOI, Soo; KIM, Seong; YANG, Yoon; OH, Wonil; NCHANG, Jong. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 17986-18001, 3 set. 2013.

JONES, B.J.; BROOKE, G.; ATKINSON, K.; MCTAGGART, S.J. Immunosuppression by Placental Indoleamine 2,3-Dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta*, [S.L.], v. 28, n. 11-12, p. 1174-1181, nov. 2007.

KAJA, Simon; PAYNE, Andrew J.; NAUMCHUK, Yuliya; KOULEN, Peter. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Current Protocols In Toxicology*, [S.L.], v. 72, n. 1, p. 55-71, maio 2017.

KANDÁROVÁ, Helena; LETÁLIOVÁ, Silvia. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology*, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 3015-3024, 1 jan. 2011.

KAPACZYŃSKA, Marta; KOLENDA, Tomasz; PRZYBYŁA, Weronika; ZAJĄCZKOWSKA, Maria; TERESIAK, Anna; FILAS, Violetta; IBBS, Matthew; BLIŪNIAK, Renata; ŁUCZEWSKI, Łukasz; LAMPERSKA, Katarzyna. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives Of Medical Science*, [S.L.], v. 4, n. 14, p. 910-919, 2016.

KHETAN, Sudhir; BURDICK, Jason A. Patterning network structure to spatially control cellular remodeling and stem cell fate within 3-dimensional hydrogels. *Biomaterials*, [S.L.], v. 31, n. 32, p. 8228-8234, nov. 2010.

KILIAN, Kristopher A.; BUGARIJA, Branimir; LAHN, Bruce T.; MRKSICH, Milan. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 107, n. 11, p. 4872-4877, mar. 2010.

KIM, Hee Jung; PARK, Jeong-Soo. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: advantages and disadvantages. *Development & Reproduction*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-10, mar. 2017.

KLEENSANG, Andre. Pathways of Toxicity. *Altex*, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 53-61, 2014.

KREWSKI, Daniel; ACOSTA, Daniel; ANDERSEN, Melvin; ANDERSON, Henry; BAILAR, John C.; BOEKELHEIDE, Kim; BRENT, Robert; CHARNLEY, Gail; CHEUNG, Vivian G.; GREEN, Sidney. Toxicity Testing in the 21st Century: a vision and a strategy. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B*, [S.L.], v. 13, n. 2-4, p. 51-138, 17 jun. 2010.

KRISHNAMURTHY, Sudha; NÖR, Jacques E. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head & Neck*, [S.L.], v. 35, n. 7, p. 1015-1021, 13 jul. 2012.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, [S.L.], v. 2018, n. 6, p. 95-97, jun. 2018.

LANG, Liwei; SHAY, Chloe; ZHAO, Xiangdong; XIONG, Yuanping; WANG, Xuli; TENG, Yong. Simultaneously inactivating Src and AKT by saracatinib/capivasertib co-delivery nanoparticles to improve the efficacy of anti-Src therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal Of Hematology & Oncology*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31864-31885, dez. 2019.

LANGHANS, Sigrid A. Three-Dimensional *in vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers In Pharmacology*, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 3015-3024, 23 jan. 2018.

LE, Van-Minh; LANG, Mei-Dong; SHI, Wei-Bin; LIU, Jian-Wen. A collagen-based multicellular tumor spheroid model for evaluation of the efficiency of nanoparticle drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 540-544, 15 out. 2014.

LEE, Jungwoo; CUDDIHY, Meghan J.; KOTOV, Nicholas A. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: state of the art. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 61-86, mar. 2008.

LEE, Jungwoo; LILLY, G. Daniel; DOTY, R. Christopher; PODSIADLO, Paul; KOTOV, Nicholas A. *In vitro* Toxicity Testing of Nanoparticles in 3D Cell Culture. *Small*, [S.L.], p. 1213-1221, 4 mar. 2009.

LEI, Hulong; YU, Bing; HUANG, Zhiqing; YANG, Xuerong; LIU, Zehui; MAO, Xiangbing; TIAN, Gang; HE, Jun; HAN, Guoquan; CHEN, Hong. Comparative analysis

of mesenchymal stem cells from adult mouse adipose, muscle, and fetal muscle. *Molecular Biology Reports*, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 885-892, 16 out. 2012.

LI, Chunxia; KATO, Mitsuo; SHIUE, Lily; SHIVELY, John E.; ARES, Manuel; LIN, Ren-Jang. Cell Type and Culture Condition–Dependent Alternative Splicing in Human Breast Cancer Cells Revealed by Splicing-Sensitive Microarrays. *Cancer Research*, [S.L.], v. 66, n. 4, p. 1990-1999, 15 fev. 2006.

LIN, Hang; SOHN, Jihee; SHEN, He; LANGHANS, Mark T.; TUAN, Rocky S. Bone marrow mesenchymal stem cells: aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*, [S.L.], v. 203, p. 96-110, maio 2019.

LOMELINO, Ronaldo de Oliveira; CASTRO-SILVA, Igor Iuco; LINHARES, Adriana Brandão Ribeiro; ALVES, Gutemberg Gomes; SANTOS, Sílvia Raquel de Albuquerque; GAMEIRO, Vinicius Schott; ROSSI, Alexandre Malta; GRANJEIRO, José Mauro. The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (β TCP/HA 70: 30) granules increases bone repair. *Journal Of Materials Science: Materials in Medicine*, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 781-788, 27 dez. 2011.

MARK, Klaus von Der; GAUSS, Verena; MARK, Helga von Der; MÜLLER, Peter. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, [S.L.], v. 267, n. 5611, p. 531-532, jun. 1977.

MARTINEZ-ZELAYA, Victor R; ZARRANZ, Laila; HERRERA, Edher Z; ALVES, Adriana T; UZEDA, Marcelo José; MAVROPOULOS, Elena; ROSSI, André L; MELLO, Alexandre; GRANJEIRO, José M; CALASANS-MAIA, Monica D. *In vitro* and *in vivo* evaluations of nanocrystalline Zn-doped carbonated hydroxyapatite/alginate microspheres: zinc and calcium bioavailability and bone regeneration. *International Journal Of Nanomedicine*, [S.L.], v. 14, p. 3471-3490, maio 2019.

MEEK, M. E.; BOOBIS, A.; COTE, I.; DELLARCO, V.; FOTAKIS, G.; MUNN, S.; SEED, J.; VICKERS, C. New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS

framework on mode of action/species concordance analysis. *Journal Of Applied Toxicology*, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 1-18, 25 out. 2013.

MEYERS, Jason; CRAIG, Jennifer; ODDE, David J. Potential for Control of Signaling Pathways via Cell Size and Shape. *Current Biology*, [S.L.], v. 16, n. 17, p. 1685-1693, set. 2006.

MITRI, Fabio; ALVES, Gutemberg; FERNANDES, Gustavo; KÖNIG, Bruno; ROSSI, Alexandre Jr; GRANJEIRO, Jose. Cytocompatibility of Porous Biphasic Calcium Phosphate Granules With Human Mesenchymal Cells by a Multiparametric Assay. *Artificial Organs*, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 535-542, 28 fev. 2012.

MOCHIZUKI, Tomoyuki; MUNETA, Takeshi; SAKAGUCHI, Yusuke; NIMURA, Akimoto; YOKOYAMA, Akiko; KOGA, Hideyuki; SEKIYA, Ichiro. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis & Rheumatism*, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 843-853, 2006.

MOSHKAYAN, Khashayar; KASHANINEJAD, Navid; WARKIANI, Majid Ebrahimi; LOCK, John G.; MOGHADAS, Hajar; FIROOZABADI, Bahar; SAIDI, Mohammad Said; NGUYEN, Nam-Trung. Spheroids-on-a-chip: recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sensors And Actuators B: Chemical*, [S.L.], v. 263, p. 151-176, jun. 2018.

MOURÃO, Carlos Fernando de Almeida Barros; LOURENÇO, Emanuelle Stellet; NASCIMENTO, Jhonathan Raphael Barros; MACHADO, Rafael Coutinho Mello; ROSSI, Alexandre Malta; LEITE, Paulo Emílio Corrêa; GRANJEIRO, José Mauro; ALVES, Gutemberg Gomes; CALASANS-MAIA, Mônica Diuana. Does the association of blood-derived growth factors to nanostructured carbonated hydroxyapatite contributes to the maxillary sinus floor elevation? A randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 369-379, 5 maio 2018.

MSEKA, Tayamika; BAMBURG, Jim R.; CRAMER, Louise P. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger

fibroblast polarization. *Journal Of Cell Science*, [S.L.], v. 120, n. 24, p. 4332-4344, 15 dez. 2007.

MUROI, Kazuo; MIYAMURA, Koichi; OHASHI, Kazuteru; MURATA, Makoto; ETO, Tetsuya; KOBAYASHI, Naoki; TANIGUCHI, Shuichi; IMAMURA, Masahiro; ANDO, Kiyoshi; KATO, Shunichi. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase i/ii study. *International Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 98, n. 2, p. 206-213, 17 jul. 2013.

N.I.C.E.A.T.M./E.C.V.A.M. Validation Study. Background Review Document (BRD): Validation of Neutral Red Uptake Test Methods NIH/*in vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Systemic Toxicity. 2006.

N.I.H. 2006. I.C.C.V.A.M. Test Method Evaluation Report (TMER): *in vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing November 2006 — NIH Publication No. 07-4519. 2006.

N.I.H. NIH Publication No. 07-4518, November 2006; 2006.

National Research Council. The National Academies Press; Washington DC: 2007. Toxicity Testing in the Twenty-First Century: A Vision and a Strategy.

NELSON, Celeste M.; BISSELL, Mina J. Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 287-309, 1 nov. 2006.

NEWSHOLME, Philip; PROCOPIO, Joaquim; LIMA, Manuela Maria Ramos; PITHON-CURI, Tania Cristina; CURI, Rui. Glutamine and glutamate?their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry And Function*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-9, 2003.

O.E.C.D. Series on Testing and Assessment Paris; France: 2010. Guidance Document No 129 on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. 2010.

PAMIES, David. A human brain microphysiological system derived from induced pluripotent stem cells to study neurological diseases and toxicity. *Altex*, [S.L.], p. 362-376, 2017.

PAMIES, David. Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems. *Altex*, [S.L.], p. 353-378, 2018.

PAMPALONI, Francesco; REYNAUD, Emmanuel G.; STELZER, Ernst H. K.. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 839-845, out. 2007.

PAMPALONI, Francesco; REYNAUD, Emmanuel G.; STELZER, Ernst H. K.. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 839-845, out. 2007.

PARK, Ji Sun; SHIM, Myung-Sun; SHIM, Sung Han; YANG, Han na; JEON, Su Yeon; WOO, Dae Gyun; LEE, Dong Ryul; YOON, Tae Ki; PARK, Keun-Hong. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- β 3. *Biomaterials*, [S.L.], v. 32, n. 32, p. 8139-8149, nov. 2011.

PATEL, Devang M.; SHAH, Jainy; SRIVASTAVA, Anand S.. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells International*, [S.L.], v. 2013, p. 1-15, 2013.

PETERSEN, O W; RØNNOV-JESSEN, L; HOWLETT, A R; BISSELL, M J. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation

pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, [S.L.], v. 89, n. 19, p. 9064-9068, out. 1992.

PIEVANI, Alice; SCAGLIOTTI, Valeria; RUSSO, Francesca Maria; AZARIO, Isabella; RAMBALDI, Benedetta; SACCHETTI, Benedetto; MARZORATI, Simona; ERBA, Eugenio; GIUDICI, Giovanni; RIMINUCCI, Mara. Comparative analysis of multilineage properties of mesenchymal stromal cells derived from fetal sources shows an advantage of mesenchymal stromal cells isolated from cord blood in chondrogenic differentiation potential. Cytotherapy, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 893-905, jul. 2014.

QUENT, Verena M.C.; LOESSNER, Daniela; FRIIS, Thor; REICHERT, Johannes C.; HUTMACHER, Dietmar W.. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. Journal Of Cellular And Molecular Medicine, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 1003-1013, 15 jan. 2010.

RANGA, Adrian; GJOREVSKI, Nikolche; LUTOLF, Matthias P.. Drug discovery through stem cell-based organoid models. Advanced Drug Delivery Reviews, [S.L.], v. 69-70, p. 19-28, abr. 2014.

RATNAYAKE, Jithendra T. B.; MUCALO, MinCHAEI; DIAS, George J.. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: a review of current trends. Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, [S.L.], v. 105, n. 5, p. 1285-1299, 15 mar. 2016.

RAVI, Maddaly; PARAMESH, V.; KAVIYA, S.R.; ANURADHA, E.; SOLOMON, F.D. Paul. 3D Cell Culture Systems: advantages and applications. Journal Of Cellular Physiology, [S.L.], v. 230, n. 1, p. 16-26, 29 set. 2014.

RESENDE, Rodrigo F. B.; FERNANDES, Gustavo V. O.; SANTOS, Sílvia R. A.; ROSSI, Alexandre M.; LIMA, Inayá; GRANJEIRO, José M.; CALASANS-MAIA, Mônica D. Long-term biocompatibility evaluation of 0.5 % zinc containing hydroxyapatite in rabbits. Journal Of Materials Science: Materials in Medicine, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 1455-1463, 21 abr. 2013.

RESENDE, Rodrigo F. B.; SARTORETTO, Suelen C.; UZEDA, Marcelo J.; ALVES, Adriana T. N. N.; CALASANS-MAIA, José A.; ROSSI, Alexandre M.; GRANJEIRO, José Mauro; CALASANS-MAIA, Mônica D.. Randomized Controlled Clinical Trial of Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite for Alveolar Bone Repair. *Materials*, [S.L.], v. 12, n. 22, p. 3645, 6 nov. 2019.

REZENDE, R.A.; PEREIRA, F.D.A.s.; KASYANOV, V.; KEMMOKU, D.T.; MAIA, I.; SILVA, J.V.L. da; MIRONOV, V.. Scalable Biofabrication of Tissue Spheroids for Organ Printing. *Procedia Cirp*, [S.L.], v. 5, p. 276-281, 2013.

RUSSELL W.M.S., BURCH R.L. Universities Federation for Animal Welfare; Wheathampstead (UK): 1959. (As Reprinted 1992). *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959.

SADAT-SHOJAI, Mehdi; KHORASANI, Mohammad-Taghi; DINPANA-KHOSHARGI, Ehsan; JAMSHIDI, Ahmad. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 7591-7621, ago. 2013.

SAEEDI, Pardis; HALABIAN, Raheleh; FOOLADI, Abbas Ali Imani. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investigation*, [S.L.], v. 6, p. 34-34, set. 2019.

SARTORETTO, Suelen C.; CALASANS-MAIA, Monica D.; ALVES, Adriana T.N.N.; RESENDE, Rodrigo F.B.; FERNANDES, Célio Junior da Costa; PADILHA, Pedro de Magalhães; ROSSI, Alexandre M.; TETI, Anna; GRANJEIRO, José M.; ZAMBUZZI, Willian F.. The role of apoptosis associated speck-like protein containing a caspase-1 recruitment domain (ASC) in response to bone substitutes. *Materials Science And Engineering: C*, [S.L.], v. 112, p. 110965, jul. 2020.

SEMINO, Carlos E.; MEROK, Joshua R.; CRANE, Gracy G.; PANAGIOTAKOS, Georgia; ZHANG, Shuguang. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid

structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation*, [S.L.], v. 71, n. 4-5, p. 262-270, jun. 2003.

SEWELL, Fiona; DOE, John; GELLATLY, Nichola; RAGAN, Ian; BURDEN, Natalie. Steps towards the international regulatory acceptance of non-animal methodology in safety assessment. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, [S.L.], v. 89, p. 50-56, out. 2017.

SHEIKH, Zeeshan; NAJEEB, Shariq; KHURSHID, Zohaib; VERMA, Vivek; RASHID, Haroon; GLOGAUER, MinCHAE. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials*, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 5744-5794, 31 ago. 2015.

SILVA, K., CÔRTEZ, I., LIECHOCKI, S., CARNEIRO, J.R., SOUZA, A.A., BOROJEVIC, R., MAYA-MONTEIRO, C.M., BAPTISTA, L.S. nCHA characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PloS One*, v. 12, p. 1-15, 2017.

SILVA, K., CÔRTEZ, I., LIECHOCKI, S., CARNEIRO, J.R., SOUZA, A.A., BOROJEVIC, SINGH, Archana; TAYALIA, Prakriti. Three-dimensional cryogel matrix for spheroid formation and anti-cancer drug screening. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, [S.L.], v. 108, n. 2, p. 365-376, 7 nov. 2019.

SOARES, Carolina Pontes; MIDDLEJ, Victor; OLIVEIRA, Maria Eduarda Weschollek de; BENCHIMOL, Marlene; COSTA, Manoel Luis; MERMELSTEIN, Cláudia. 2D and 3D-Organized Cardiac Cells Shows Differences in Cellular Morphology, Adhesion Junctions, Presence of Myofibrils and Protein Expression. *Plos One*, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 38147-38154, 25 maio 2012.

SODUNKE, T; TURNER, K; CALDWELL, S; MCBRIDE, K; REGINATO, M; NOH, H. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials*, [S.L.], v. 28, n. 27, p. 4006-4016, set. 2007.

SONG, Na; SCHOLTEMEIJER, Martijn; SHAH, Khalid. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. Trends In Pharmacological Sciences, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 653-664, set. 2020.

TIBBITT, Mark W.; ANSETH, Kristi S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. Biotechnology And Bioengineering, [S.L.], v. 103, n. 4, p. 655-663, 1 jul. 2009.

TREDAN, O.; GALMARINI, C. M.; PATEL, K.; TANNOCK, I. F. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. Jnci Journal Of The National Cancer Institute, [S.L.], v. 99, n. 19, p. 1441-1454, 25 set. 2007.

TRUSKEY, George A.. Human Microphysiological Systems and Organoids as *in vitro* Models for Toxicological Studies. Frontiers In Public Health, [S.L.], v. 6, n. 185, p. 3015-3024, 10 jul. 2018.

URICH, Eduard; PATSCH, Christoph; AIGNER, Stefan; GRAF, Martin; IACONE, Roberto; FRESKGÅRD, Per-Ola. Multicellular Self-Assembled Spheroidal Model of the Blood Brain Barrier. Scientific Reports, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 204-218, 20 mar. 2013.

VALIENSE, Helder; BARRETO, Mauricio; RESENDE, Rodrigo F.; ALVES, Adriana T.; ROSSI, Alexandre M.; MAVROPOULOS, Elena; GRANJEIRO, José M.; CALASANS-MAIA, Mônica D. *In vitro* and *in vivo* evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits. Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, [S.L.], v. 104, n. 2, p. 274-282, 26 fev. 2015.

VASANTHAN, Jayavardini; GURUSAMY, Narasimman; RAJASINGH, Sheeja; SIGAMANI, Vinoth; KIRANKUMAR, Shivaani; THOMAS, Edwin L.; RAJASINGH, Johnson. Role of Human Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Therapy. Cells, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 54, 31 dez. 2020.

WANG, Y., CHEN, X., CAO, W., SHI, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nature Immunology, v.15, p. 1009–1016, 2014.

WEAVER, Valerie M; LELIÈVRE, Sophie; LAKINS, Johnathon N; ACHRENEK, Micah; JONES, Jonathan C.R; GIANCOTTI, Filippo; WERB, Zena; BISSELL, Mina J. β 4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 205-216, set. 2002.

WEISWALD, Louis-Bastien; BELLET, Dominique; DANGLES-MARIE, Virginie. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-15, jan. 2015.

WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, [S.L.], v. 29, n. 20, p. 2941-2953, jul. 2008.

WILLIAMS, David F. Specifications for Innovative, Enabling Biomaterials Based on the Principles of Biocompatibility Mechanisms. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, [S.L.], v. 7, p. 31864-31885, 9 out. 2019.

XINARIS, Christodoulos; BRIZI, Valerio; REMUZZI, Giuseppe. Organoid Models and Applications in Biomedical Research. *Nephron*, [S.L.], v. 130, n. 3, p. 191-199, 2015.

XU, Wenrong; ZHANG, Xiran; QIAN, Hui; ZHU, Wei; SUN, Xiaochun; HU, Jiabo; ZHOU, Hong; CHEN, YongnCHAng. Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Bone Marrow Differentiate into a Cardiomyocyte Phenotype *In vitro*. *Experimental Biology And Medicine*, [S.L.], v. 229, n. 7, p. 623-631, jul. 2004.

YAMADA, Kenneth M.; CUKIERMAN, Edna. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*, [S.L.], v. 130, n. 4, p. 601-610, ago. 2007.

ANEXO I

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO / HUCFF-
UFRJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOFABRICAÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS-TRONCO DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO PARA TOXICOLOGIA E MEDICINA REGENERATIVA.

Pesquisador: Leandra Santos Baptista

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 25818719.4.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.783.797

Apresentação do Projeto:

Protocolo 417-19 recebido em 18/11/2019.

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO / HUCFF-
UFRJ



Continuação do Parecer: 3.783.797

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	12/11/2019 10:41:38	Leandra Santos Baptista	Aceito
Outros	FolhaDeRosto_editavel.pdf	12/11/2019 10:40:34	Leandra Santos Baptista	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	12/11/2019 10:40:03	Leandra Santos Baptista	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 19 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador(a))