UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ROBSON LUIS FERRAZ DO AMARAL

Análise comparativa de diferentes sistemas de cultivo tridimensionais para estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de bexiga para ensaios de eficácia terapêutica

Ribeirão Preto
2020

ROBSON LUIS FERRAZ DO AMARAL

Análise comparativa de diferentes sistemas de cultivo tridimensionais para estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de bexiga para ensaios de eficácia terapêutica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador(a): Profa. Dra. Kamilla Swiech Antonietto

Ribeirão Preto
2020

AMARAL, R. L. F.	**Análise comparativa de diferentes sistemas de cultivo tridimensionais para estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de bexiga para ensaios de eficácia terapêutica**	Espaço de **2,5 cm** reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUTORADO FCFRPUSP 2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Amaral, Robson Luis Ferraz do

Análise comparativa de diferentes sistemas de cultivo tridimensionais para estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de bexiga para ensaios de eficácia terapêutica. Ribeirão Preto, 2020.

250 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Antonietto, Kamilla Swiech.

1. Cultura 3D. 2. Esferoides tumorais. 3. Câncer de bexiga.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Robson Luis Ferraz do Amaral
Análise comparativa de diferentes sistemas de cultivo tridimensionais para estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de bexiga para ensaios de eficácia terapêutica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico esta tese à Universidade Pública brasileira e a todos os corajosos pesquisadores e cientistas deste país.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao Ensino Superior público brasileiro de qualidade, em especial à Universidade de São Paulo, por permitir que eu tenha hoje um título de Bacharel em Ciência Biológicas e a chance de defender uma tese de doutorado.

À Professora Dra. Kamilla Swiech, pelo privilégio e prestígio de poder ter sido orientado nos últimos 10 anos por uma mulher, mãe e cientista, de profissionalismo e dedicação inigualáveis. Detentora da minha eterna admiração, Kamilla é exemplo e inspiração para mim, para seus demais alunos, e para todos que lutam por reconhecimento, respeito e visibilidade cada vez maiores às mulheres pesquisadoras neste país.

Ao Prof. Dr. Chong-Xian Pan, por ter me dado a oportunidade de compor seu grupo de pesquisa por seis meses e pela confiança e reconhecimento de meu trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, seu corpo docente e funcionários, por proporcionarem um ambiente rico em conhecimento e essencial ao meu desenvolvimento profissional.

Ao Department of Internal Medicine, Division of Hematology and Oncology da University of California Davis Medical School pela receptividade calorosa durante a realização de parte do doutorado no exterior.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial, à ex-coodernadora Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez e ao coordenador Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, pelo apoio e incentivo que recebi diretamente dos dois no início e no final de meu doutorado.

Aos secretários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Eleni Angeli Passos e Henrique Theodoro, pela dedicação, paciência e auxílio.

Às Professoras Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, Dra. Andréia Machado Leopoldino e Dra. Ângela Maria Moraes pelas colaborações que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Mariza Miranda Abreu, Dra. Maike Zimmermann, Dra. Ai-Hong Ma, Dr. Hongyong Zhang e Dr. Lucas Oliveira Souza pela colaboração direta em experimentos que compõem esta tese.

À Professora Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley e ao Professor Dr. Roberto Santana da Silva da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo apoio e infraestrutura fornecida para que alguns experimentos pudessem ser realizados.

Às funcionárias Maria Dolores Seabra Ferreira, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela ajuda no preparo das amostras para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), e Camila Menezes, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelas análises de citometria de fluxo.

À Dra. Amanda Mizukami, Dra. Carol Caliari, Ma. Monize Decarli, Dra. Larissa Bueno Tofani, Ma. Letícia Bueno, Dra. Renata Spagolla, Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro pelas horas incansáveis de discussões a respeito deste trabalho.

À Lilian Moreira Mendes pela revisão da versão final da tese.

Este trabalho foi realizado com o apoio do(a):

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2015/05102-1 (3 anos de bolsa de Doutorado Direto).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 443981/2014-0 (3 anos de Auxílio à Pesquisa).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – (Processo 88881.133479/2016-01) – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), realizado no período de 01/07/2017 a 30/12/2017 na University of California Davis Medical School, Sacramento, Califórnia, EUA.

Agradecimentos especiais

Agradeço à mulher que mais amo nessa vida, minha mãe, Vera Alice, que sempre me apoiou, incentivou e esteve ao meu lado durante esta jornada.

Ao meu pai, Ló, que não pôde presenciar o final deste percurso, mas que era quem mais tinha certeza de que este dia chegaria.

À toda a minha família, em especial à minha segunda mãe, Vera Lúcia, meu segundo pai, Tadeu, e às minhas pequenas Maria Isabella e Helena Maria, que formam os principais pilares da minha vida.

À família que me acolheu na Califórnia, Dino Grassini e Stephen Phillips.

A todos que são e foram do Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares da FCFRP (eternos “Kamilletes”), em especial, Angelo, Amanda, Larissa, Rafael, Matheus, Natália Leite, Nathália Santos, Maiane, Tárik e Marlon, e técnicos Ângela e Fernando, por encherem os meus dias de alegria, todos os dias, sem exceção.

Por fim, a todos aqueles que me fazem a pessoa mais feliz deste mundo por tê-los em minha vida. Em especial, Ciça, Loba, Duda, Julinha, Palito, Juliana Ribeiro, Manoela, Birdo, Manga, Piri, Nathália Feitosa, Ket, Sptz, Dahyes, Andruw, Gabriela Rezende, Marcela Freitas, Giuliana Bertolino, Aline, Marcela Tavares, Giovanni, Juliana Abriata, Isabella, Tais, Guilherme, Elisa, André, Giulia, Ivna, Tanaka, Bruna, Jacú, GPS, Tatiana Magalhães, Blanka, Pepino, Poti, Patrícia, Tiago, Zana, Taty, Bruno Japa, Perse, Topeira, Marcelly Cunha, Anselmo e Fernanda.

“Your faith was strong, but you needed proof.”

(Leonard Cohen)

RESUMO

AMARAL, R. L. F. **Análise comparativa de diferentes sistemas de cultivo tridimensionais para estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de bexiga para ensaios de eficácia terapêutica.** 2020. 250 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Diferentes técnicas de cultivos tridimensionais (3D) foram avaliadas a fim de estabelecer um modelo de câncer de bexiga com capacidade de recapitular *in vitro* características do tumor *in vivo*. Na primeira parte, utilizando a linhagem celular de câncer de bexiga RT4, compararam-se sistemas de cultivo 3D livres de suporte, utilizando as técnicas de flutuação forçada (Placas ULA, *Ultra low attachment*) e gota suspensa (Placas HD, *hanging drop*), e sistemas de cultivo dependentes de suporte, utilizando microcarregadores e hidrogéis (Matrigel, Alginato e HydroMatrix), quanto à formação de esferoides RT4. Estes foram caracterizados quanto aos aspectos morfológicos, de crescimento celular e metabolismo. Somente os cultivos utilizando as técnicas ULA, HD e os suportes Matrigel (50% v/v) e HydroMatrix (0,25% v/v) foram capazes de gerar esferoides com parâmetros de forma adequados (solidez > 0,95; esfericidade ~ 0,90; arredondamento entre 0,7 e 0,9). Nos cultivos ULA e HD, foi gerado um único esferoide por poço, com diâmetros entre 200 e 600 µm. O crescimento celular e, consequentemente, o metabolismo nos esferoides foram inferiores ao observado nos cultivos 2D. Os cultivos em Matrigel e HydroMatrix, por sua vez, geraram vários esferoides por poço, com diâmetros que não ultrapassaram 200 µm. Os esferoides em Matrigel apresentaram crescimento celular e metabolismo superiores aos observados nos cultivos 2D. Foram selecionados os esferoides RT4 gerados em ULA e em Matrigel para a avaliação da sensibilidade à Doxorrubicina (DOX) e da expressão de genes comumente superexpressos em tumores sólidos de bexiga. Os esferoides RT4 gerados em ULA foram menos sensíveis ao tratamento com DOX (IC_{50} 8,62 ± 1,53 µM) do que os cultivos 2D (IC_{50} 2,35 ± 0,39 µM) e Matrigel (IC_{50} 3,31 ± 1,28 µM). Nos esferoides RT4 em ULA, houve maior expressão dos genes *ALDH1A1* e *H-RAS*, dois dos principais genes envolvidos nos mecanismos de resistência e reincidência de tumores de bexiga. Já nos cultivos em Matrigel, quase todos os genes analisados foram mais expressos (*HIF-1α, IFIT5, MDR-1, IL3, ALDH1A1 e H-RAS*). Na segunda parte do projeto, a estratégia de cultivo em ULA com 5% Matrigel foi utilizada com sucesso para a geração de esferoides com células primárias de tumor de bexiga humano (BL0293 e BL0808) derivados de modelos PDX (*patient-derived xenografts*). Os esferoides apresentaram diâmetros que variaram de 200 a 1.200 µm, e os formados com menores números iniciais de células foram caracterizados como mais esféricos (IE > 0,90), regulares (solidez > 0,90) e redondos (arredondamento > 0,9). Os perfis de sensibilidade dos esferoides BL0293 e BL0808 à Cisplatina e à Gemcitabina foram semelhantes aos obtidos previamente nos ensaios *in vivo* com os modelos PDX BL0293 e BL0808. De forma geral, foi possível concluir que os cultivos 3D realizados utilizando a técnica de gota suspensa em placas ULA e em Matrigel foram capazes de recapitular *in vitro* características do tumor *in vivo*, podendo ser considerados como promissores modelos 3D de câncer de bexiga.

Palavras-chave: Cultivos 3D; Esferoides tumorais; Modelo *in vitro*; Câncer de bexiga.

ABSTRACT

AMARAL, R. L. F. **Comparative analysis of different three-dimensional culture systems for the establishment of an *in vitro* bladder cancer model for therapeutic-efficacy assays.** 2020. 250 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Different three-dimensional (3D) cell cultures techniques were evaluated in order to establish a bladder cancer model with the ability to recapitulate *in vitro* the tumor features observed *in vivo*. Using the bladder cancer cell line RT4, the first part of the project focused on comparing the scaffold-free 3D cell culture systems, employing forced floating (Ultra-low attachment plates, ULA) and hanging drop (HD plates) techniques, and scaffold-dependent systems, employing microcarriers and hydrogels (Matrigel, Alginate and HydroMatrix), to generate RT4 spheroids. These were characterized regarding morphological parameters, cell growth and metabolism. Only 3D cell culture using the forced floating and hanging drop techniques, and Matrigel (50% v/v) and HydroMatrix (0.25% v/v) scaffolds, were able to generate spheroids with suitable parameters (solidity>0.95; sphericity~0.90; rounding between 0.70-0.90). In the ULA and HD cell cultures, a single spheroid was generated per well, with diameters ranging between 200 and 600 µm. The cell growth and, consequently, the metabolism observed in these spheroids were lower than in 2D cultures. The Matrigel and HydroMatrix cultures, on the other hand, generated several spheroids per well, with diameters that did not exceed 200 µm. The spheroids in Matrigel showed cell growth and metabolism higher than those observed in 2D cultures. RT4 spheroids generated in ULA plates and Matrigel were selected to assess the Doxorubicin (DOX) sensitivity and the expression of commonly overexpressed genes in solid bladder tumors. ULA plates' spheroids were less sensitive to DOX treatment (IC_{50} 8.62 ± 1.53 µM) than 2D (IC_{50} 2.35 ± 0.39 µM) and Matrigel (IC_{50} 3.31 ± 1.28 µM) cultures. Moreover, it was observed a higher expression of *ALDH1A1* and *HRAS* genes in RT4 spheroids generated in ULA, two of the main genes involved in the mechanisms of resistance and recurrence of bladder tumors. Almost all the analyzed genes (*HIF-1α, IFIT5, MDR-1, IL3, ALDH1A1* and *HRAS*) were more expressed in Matrigel cultures. In the second part of the project, the strategy based on the use of ULA cultures with 5% of Matrigel (v/v) was successfully applied to generate spheroids using primary human bladder tumor cells (BL0293 and BL0808) derived from PDX models (patient-derived xenografts). The spheroids generated showed diameters ranging from 200 to 1200 µm, and those initiated with the smaller numbers of cells were characterized as more spherical (sphericity>0.90), regular (solidity>0.90) and round (roundness>0.90). The sensitivity profiles of the BL0293 and BL0808 spheroids to Cisplatin and Gemcitabine were similar to those obtained previously in the *in vivo* tests using PDX models BL0293 and BL0808. In general, it was possible to conclude that both 3D cultures generated using the forced floating technique (ULA plates) and Matrigel scaffold were able to recapitulate *in vitro* some characteristics of the solid tumor *in vivo* and can be considered as promising 3D models of bladder cancer.

Keywords: 3D cell culture; Tumor spheroids; *In vitro* models; Bladder cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais características dos tumores sólidos *in vivo* e esferoides tumorais *in vitro*..... 20
Figura 2. Esquema dos diferentes sistemas e técnicas aplicadas às tecnologias de cultivo 3D..... 33
Figura 3. Diferentes técnicas aplicadas nos cultivos 3D livres de suporte..... 34
Figura 4. Diferentes técnicas aplicadas nos cultivos 3D dependentes de suporte..... 39
Figura 5. Novas abordagens técnicas aplicadas nos cultivos 3D..... 48
Figura 6. Organização espacial e morfologia das células RT4 cultivadas em monocamada..... 85
Figura 7. Cultivo em monocamada das células RT4 em microplacas de 96 poços..... 86
Figura 8. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços ULA. 88
Figura 9. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços HD... 89
Figura 10. Estrutura superficial dos esferoides RT4 cultivados em microplacas de 96 poços ULA e HD 91
Figura 11. Microscopia de campo claro e fluorescência do cultivo 3D das células RT4 em microcarregadores Cultispher G..... 93
Figura 12. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços com Matrigel 50% (v/v)..... 95
Figura 13. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços com alginato 2% (v/v)..... 96
Figura 14. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços com HydroMatrix 0,25% (v/v)..... 98
Figura 15. Diâmetro dos esferoides RT4 nas culturas em ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo..... 100
Figura 16. Distribuição dos diâmetros dos esferoides RT4 nas culturas em Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo..... 102
Figura 17. Parâmetros de forma dos esferoides RT4 nas culturas em ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo..... 105

Figura 18. Frequência dos parâmetros de forma dos esferoides RT4 nas culturas em Matrigel ao longo de 240 horas de cultivo..... 107
Figura 19. Frequência dos parâmetros de forma dos esferoides RT4 nas culturas em HydroMatrix ao longo de 240 horas..... 110
Figura 20. Crescimento e viabilidade das células RT4 nos cultivos em monocamada, ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo..... 114
Figura 21. Crescimento e viabilidade das células RT4 nos cultivos em monocamada, Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo..... 117
Figura 22. Apoptose nos cultivos em monocamada, ULA e HD das células RT4 em 120 e 168 horas de cultivo..... 119
Figura 23. Apoptose nos cultivos em monocamada, Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo..... 120
Figura 24. Perfil metabólico das células RT4 nos cultivos em monocamada, ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo..... 122
Figura 25. Perfil metabólico das células RT4 nos cultivos em Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo..... 124
Figura 26. Cultivos de células RT4 em monocamada, ULA, HD, Matrigel e HydroMatrix pré e pós-tratamento com Doxorrubicina..... 131
Figura 27. Viabilidade celular dos cultivos de células RT4 em monocamada, ULA e Matrigel após tratamento com Doxorrubicina..... 132
Figura 28. Expressão gênica das células RT4 nos cultivos em ULA e Matrigel em relação aos cultivos em monocamada..... 135
Figura 29. Células tumorais e estromais primárias provenientes dos modelos PDX de câncer de bexiga..... 142
Figura 30. Cultivos das células BL0293 em microplacas ULA com e sem Matrigel em 24 e 168 horas de cultivo..... 143
Figura 31. Cultivos 3D dos esferoides BL0293 em microplacas ULA com 5% Matrigel ao longo de 240 horas de cultivo..... 144
Figura 32. Cultivos 3D dos esferoides BL0808 em microplacas ULA com 5% Matrigel ao longo de 240 horas de cultivo..... 145
Figura 33. Diâmetro dos esferoides BL0293 e BL0808 ao longo de 240 horas de cultivo..... 147

Figura 34. Parâmetros de forma dos esferoides BL0293 e BL0808 ao longo de 240 horas de cultivo..... 148
Figura 35. Crescimento e viabilidade das células BL0293 e BL0808 nos cultivos 3D ao longo de 240 horas..... 150
Figura 36. Imunomarcação fluorescente dos esferoides BL0293 e BL0808 após 144 horas de cultivo..... 152
Figura 37. Viabilidade celular dos esferoides BL0293 e BL0808 após tratamento com Cisplatina e Gemcitabina por 24, 48 e 72 horas..... 153
Figura 38. Alteração no volume dos tumores dos modelos *in vivo* PDX após tratamento com Cisplatina e Gemcitabina..... 154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais vantagens e desvantagens dos modelos pré-clínicos utilizados no processo de descobrimento de novos fármacos..... 15
Tabela 2 – Principais vantagens e desvantagens das técnicas de cultivo 3D livres de suportes para geração de esferoides tumorais..... 35
Tabela 3 – Principais vantagens e desvantagens das técnicas de cultivo 3D dependentes de suportes, sólidos ou hidrogéis, para geração de esferoides tumorais..... 41
Tabela 4 – Principais vantagens e desvantagens de novas abordagens técnicas de cultivo 3D para geração de esferoides tumorais..... 49
Tabela 5 – Sistemas e condições utilizados nos cultivos 3D das células RT4 com o microcarregador Cultispher G..... 68
Tabela 6 – Sequência dos *primers* utilizados nos ensaios de expressão gênica 80
Tabela 7 – Comparação dos principais resultados obtidos nas culturas 3D de células RT4 empregando diferentes técnicas de cultivo..... 126
Tabela 8 – Média dos valores de IC_{50} (μM), e desvio-padrão, obtidos nas diferentes curvas de dose-resposta para cada um dos diferentes cultivos..... 132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
3Rs	*Refine*, *Reduce*, *Replace*
AACR	American Association for Cancer Research
ALDH	*Aldehyde dehydrogenase*
ANG	Angiogenina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	*Adenosine triphosphate*
AVMA	American Veterinary Medical Association
Bak	*B-cell lymphoma 2 homologous antagonist/killer*
Bax	*B-cell lymphoma 2 associated*
BCG	*Bacillus Calmette-Guérin*
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
Bcl-xL	*B-cell lymphoma 2-extra large*
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
bFGF	*Basic fibroblast growth factor*
Bid	*BH3 interacting-domain death agonist*
BSA	*Bovine serum albumin*
CA	*Carbonic anhydrase*
CAM	*Cell adhesion molecules*
cDNA	DNA complementar
cFLIP	*Cellular FLICE-like inhibitory protein*
Concea	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTT	Célula-tronco tumoral
DANT	Doenças e agravos não transmissíveis
DMEM	*Dulbeccos's modified Eagle medium*
DMSO	*Dimethylsulfoxid*
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	*Epidermal growth factor*

EMA	European Medicine Agency
ERCC	*Excision repair cross-complementation*
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAC	Fibroblastos associados ao câncer
FADD	*Fas Associated Via Death Domain*
FAK	*Focal adhesion kinase*
FDA	Food and Drug Administration
FDA	*Fluorescein diacetate*
FF	Difenilalanina
FGF	*Fibroblast growth factors*
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
FLAME	*FADD-like antiapoptotic molecule*
Fmoc	Fluorenilmetoxicarbonil
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GLUT-1	*Glucose transporter protein isoform 1*
H-RAS	*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*
H&E	Hematoxilina e eosina
HA	Ácido hialurônico
HCA	*High-content analysis*
HCS	*High-content screening*
HD	*Hanging-drop*
HER	*Human epidermal growth factor receptor*
HGF	*Hepatocity growth factor*
HIF	*Hypoxia-inducible factors*
HIV	*Human immunodeficiency virus*
hNSC	*Neural stem cell*
HP1α,	*Heterochromatin protein 1α*
HRAS	*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*
HTS	*High throughput screening*
HUB	*Hubrecht Organoid Technology*
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
IC50	*Half maximal inhibitory concentration*
IE	Índice de esfericidade

IFIT	*Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats*
IGF	*Insulin-like growth factor-1*
Il2RG	*Interleukin 2 receptor gamma*
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JAXCC	The Jackson Laboratory Cancer Center
LDH	Lactato desidrogenase
LSFM	*Light sheet-based fluorescence microscopy*
Mcl-1	*Myeloid cell leukemia-1*
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
MDR	*Multiple drug resistance*
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscópios de força atômica
MMP	*Matrix metalloproteinase*
mRNA	RNA mensageiro
MTS	*Multicelular tumor spheroids*
MTT	Brometo de 3-4,5 dimetiltiazol-2, 5 difeniltetrazólio
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NCI	National Cancer Institute
NER	*Nucleotide excision repair*
NF-kB	*Nuclear factor kappa B*
NGF	*Nerve growth factor*
NGS	*Next generation sequencing*
NOD	*Non-obese diabetic*
NSG™	NOD scid gama
OC	*Organ-on-a-chip*
P-gp	Glicoproteína de membrana P
PAAm	Poliacrilamida
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCL	Policaprolactona
PCR	*Reverse-transcriptase polymerase chain reaction*
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PDO	*Patient-derived tumor organoid*

PDS	*Patient-derived tumor spheroid*
PDX	*Patient-derived xenografts*
PEG	Poli(etileno glicol)
PFA	Paraformaldeído
PFI	Pressão do fluido intersticial
PHB	Poli(hidroxibutirato)
PI	*Propidium iodide*
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poli(ácido lático-glicólico)
Poli-HEMA	Poli(2-Hidroxietilmetacrilato)
pRb	Proteína retinoblastoma
PU	Poliuretano
PVA	Poli(álcool vinílico)
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
Rag	*Recombination-activating genes*
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
RNA	*Ribonucleic acid*
RT-qPCR	Transcrição reversa associada a PCR quantitativo em tempo real
RWW	*Rotating wall vessel bioreactor*
scid	*Severe combined immunodeficiency*
SFB	Soro fetal bovino
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
SUS	Sistema Único de Saúde
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF-β	*Transforming growth factor beta*
ULA	*Ultra-low attachment*
URL	Unidades Relativas de Luminescência
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
XP	*Xeroderma pigmentosum complementation*
y-PGA	Poli(ácido γ-glutâmico)
ZEB	*Zinc finger E-box-binding homeobox*

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas vi
Lista de abreviaturas e siglas vii

1 INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Desenvolvimento de novos fármacos para tratamento do câncer..... 2
1.1.1 Câncer de bexiga..... 4
1.1.2 Modelos pré-clínicos..... 7
1.2 Tecnologia de cultivos tridimensionais (3D)..... 16
1.2.1 Cultivo 3D de células tumorais..... 17
1.2.2 Características dos esferoides tumorais..... 19
1.2.3 Resistência dos esferoides a fármacos antineoplásicos..... 27
1.3 Sistemas de cultivos 3D..... 32
1.3.1 Sistemas livres de suportes..... 33
1.3.1.1 Técnica de cultivo: flutuação forçada..... 36
1.3.1.2 Técnica de cultivo: gota suspensa..... 36
1.3.1.3 Técnica de cultivo: levitação magnética..... 37
1.3.1.4 Técnica de cultivo: levitação por ultrassom..... 37
1.3.1.5 Técnica de cultivo: agitação..... 37
1.3.2 Sistemas de cultivo 3D dependentes de suportes..... 39
1.3.2.1 Técnica de cultivo: suportes sólidos..... 42
1.3.2.2 Técnica de cultivo: embebidos em hidrogéis..... 44
1.3.3 Novas abordagens de cultivo 3D..... 48
1.3.3.1 Técnica de microencapsulamento de esferoides..... 49
1.3.3.2 Técnica de bioimpressão de células tumorais..... 50
1.3.3.3 Técnica de cultivo em perfusão..... 51
1.3.3.4 Técnica microfluídica..... 52
1.4 Métodos para caracterização dos cultivos 3D..... 54

2 JUSTIFICATIVA..... 59

3 OBJETIVOS..... 61
3.1 Objetivos específicos..... 62

4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 63
4.1 Células e condições de cultivo..... 64
4.1.1 Linhagem celular RT4..... 64
4.1.2 Células primárias humanas provenientes de modelos PDX..... 64
4.1.2.1 Modelos PDX BL0293 e BL0808..... 65
4.1.2.2 Isolamento das células tumorais BL0293 e BL0808..... 65
4.2 Cultivo 2D com células RT4..... 66
4.3 Geração dos cultivos 3D com células RT4..... 67
4.3.1 Técnica de flutuação forçada..... 67
4.3.2 Técnica de gota suspensa..... 67
4.3.3 Microcarregadores..... 68

4.3.4 Matrigel..... 69
4.3.5 Alginato..... 69
4.3.6 HydroMatrix..... 70
4.4 Geração dos cultivos 3D BL0293 e BL0808..... 70
4.5 Métodos quantitativos de caracterização..... 71
4.5.1 Análise dos parâmetros morfológicos..... 71
4.5.2 Análise de crescimento e viabilidade celular..... 72
4.5.2.1 Quantificação direta..... 72
4.5.2.2 Quantificação indireta..... 73
4.5.3 Análise de apoptose..... 74
4.5.3.1 Quantificação direta..... 74
4.5.3.2 Quantificação indireta..... 74
4.5.4 Análise do metabolismo celular..... 75
4.6 Métodos qualitativos de caracterização..... 75
4.6.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)..... 75
4.6.2 Avaliação de superfície celular por microscopia de varredura..... 76
4.6.3 Marcação de células viáveis com FDA..... 76
4.6.4 Imunomarcação de células proliferativas e apoptóticas..... 77
4.7 Avaliação da sensibilidade a fármacos antineoplásicos..... 78
4.7.1 Tratamento dos cultivos 2D e 3D de células RT4 com Doxorrubicina.... 78
4.7.1.1 Cálculo do IC_{50}..... 79
4.7.2 Tratamento dos cultivos 3D BL0293 e BL0808 com Cisplatina e Gemcitabina..... 79
4.8 Avaliação do perfil de expressão gênica dos cultivos 2D e 3D..... 80
4.8.1. Extração de RNA 81
4.8.2. Síntese de RNA 81

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 83
5.1 Culturas com linhagem celular humana de câncer de bexiga..... 84
5.1.1 Cultivo 2D com células RT4..... 85
5.1.2 Geração dos cultivos 3D com células RT4..... 87
5.1.2.1 Cultivos 3D livres de suportes: flutuação forçada e gota suspensa..... 87
5.1.2.2 Cultivos 3D dependentes de suporte sólido: microcarregadores..... 92
5.1.2.3 Cultivos 3D dependentes de suporte em hidrogéis: alginato, Matrigel e hidrogel de peptídeo..... 94
5.1.3 Caracterização dos cultivos 3D com células RT4..... 99
5.1.3.1 Tamanho..... 99
5.1.3.2 Parâmetros de forma..... 104
5.1.3.3 Crescimento celular e viabilidade..... 112
5.1.3.4 Metabolismo celular..... 121
5.1.4 Seleção das técnicas de cultivo 3D..... 126
5.1.5 Sensibilidade dos cultivos 2D e 3D à Doxorrubicina..... 130
5.1.6 Perfil de expressão gênica dos cultivos 3D..... 134
5.2 Culturas 3D com células primárias humanas de câncer de bexiga..... 141
5.2.1 Geração dos cultivos 3D BL0293 e BL0808..... 141
5.2.2 Caracterização dos cultivos 3D BL0293 e BL0808..... 146
5.2.2.1 Tamanho e parâmetros de forma..... 146
5.2.2.2 Crescimento e viabilidade celular..... 149
5.2.2.3 Presença de células proliferativas e hipóxicas..... 151

5.2.3 Avaliação da sensibilidade dos cultivos 3D e modelos PDX BL0293 e BL0808 à Cisplatina e Gemcitabina..... 153

6 CONCLUSÕES..... 159

7 TRABALHOS FUTUROS..... 162

8 REFERÊNCIAS..... 165

9 ANEXOS 224

1. Introdução

1.1 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER

As principais causas de adoecimento e óbito da população mundial são as doenças e agravos não transmissíveis (DANT), principalmente as doenças cardiovasculares (aproximadamente 50% dos óbitos) e o câncer (aproximadamente 20%) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Câncer é um nome genérico dado a uma gama de doenças causadas por uma neoplasia maligna. A neoplasia, de forma geral, é um fenômeno de proliferação anormal de células que pode levar a um aumento no volume de regiões dos tecidos e órgãos, o tumor. As neoplasias benignas são caracterizadas por possuírem crescimento mais organizado e lento. As neoplasias malignas, por sua vez, tendem a se multiplicar rapidamente e podem espalhar-se para outras regiões do corpo, levando a danos na homeostase do organismo (RASSY *et al*., 2020). Além da proliferação descontrolada, outras características das células neoplásicas malignas são: instabilidade genética; mecanismos de escape do processo de apoptose; manutenção da angiogênese; e capacidade de não ser reconhecida pelo sistema imunológico (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Importante ressaltar que o desenvolvimento do câncer depende não só de alterações intracelulares, mas também de interações dessas células com o microambiente onde estão inseridas (CONMY & NASHEUER, 2010).

Dependendo do tecido de origem, as neoplasias podem ser classificadas como sólidas, quando os tumores ficam restritos aos órgãos de origem e, em alguns casos, apresentam metástase para outros órgãos; ou não sólidas, quando têm origem no tecido hematológico ou no sistema linfático e podem circular pelo organismo. Como exemplo de tumores sólidos, temos os sarcomas, que se originam do tecido conjuntivo; e os carcinomas, que se originam dos tecidos epiteliais e ainda podem ser classificados em epidermoides, quando originados de epitélio, e adenocarcinomas, quando originários de ductos e glândulas. Os principais tumores hematológicos são as leucemias, que se iniciam na medula óssea; os linfomas, que se originam no sistema linfático; e o mieloma múltiplo, que se desenvolve a partir dos plasmócitos. Os tumores podem ser classificados também de acordo com o grau de agressividade, ou seja, a capacidade de tornarem-se invasivos e de espalharem-se pelo organismo (desenvolverem metástase) (INCA, 2017).

Estima-se que no ano de 2030 haverá cerca de 22 milhões de novos casos de câncer no mundo (BRAY *et al*., 2012); no Brasil, a doença é a segunda causa de mortes. Avalia-se que ocorreram 600 mil novos casos de câncer no biênio 2018-2019 no território brasileiro, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, Rio de Janeiro, Brasil). O tipo mais incidente é o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil novos casos por ano), seguido pelos de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto. Além disso, estimou-se um aumento nas taxas de incidência para os cânceres de colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2017). Além do sofrimento enfrentado por milhares de famílias, essa doença também gera gastos significativos para o governo. De acordo com o estudo realizado pela Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa (Interfarma), o Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil chegou a gastar 4,7 bilhões de reais em tratamentos contra o câncer no ano de 2017 (IQVIA, 2017). Os principais tratamentos disponíveis hoje são a radioterapia (uso de radiação para eliminar as células tumorais); a quimioterapia (administração de compostos com ação antineoplásica); as terapias-alvo (compostos direcionados a moléculas específicas do tumor que direcionam a ação do fármaco); e a cirurgia de ressecção (remoção do tecido tumoral do organismo) (LIU *et al*., 2019). Dentre eles, a quimioterapia é a abordagem mais utilizada desde 1940 (CHABNER & ROBERTS, 2005). Atualmente, é vasto o número de fármacos disponíveis para o tratamento do câncer. No entanto, muitos ainda apresentam ineficácia recorrente e podem desencadear efeitos colaterais no paciente. Por isso, tanto os pesquisadores na área de oncologia quanto a indústria farmacêutica continuam na busca de novos compostos com ação antineoplásica para o desenvolvimento de medicamentos cada vez mais eficazes.

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo bastante complexo e de alto custo (LIU *et al*., 2019). Esse processo pode ser divido em 4 estágios principais: (1) descobrimento de compostos com ação antineoplásica; (2) ensaios pré-clínicos; (3) ensaios clínicos, estes divididos em fase I, II e III; (4) aprovação pelas agências regulatórias e comercialização. São as agências regulatórias, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, Brasília, Brasil), a Food and Drug Administration (FDA, Silver Spring, EUA) e a European Medicine Agency (EMA, Amsterdã, Holanda), que estabelecem os requerimentos que um composto deve possuir para aprovação e comercialização. O Centro Trufts para o Estudo do Desenvolvimento de Medicamentos (grupo acadêmico sem fins lucrativos da

Universidade Trufts, em Boston) estima que, do descobrimento de um novo composto com ação antineoplásica até seu lançamento no mercado, sejam necessários no mínimo 10 anos, e o custo desse processo pode chegar a US$ 2,6 bilhões (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016; ZHANG & TANG, 2018). Alguns autores defendem que os gastos com o processo de desenvolvimento são normalmente recuperados em um curto espaço de tempo após a comercialização desses medicamentos, no entanto, sabe-se que muitos destes não conseguem autorização das agências regulatórias para serem comercializados ou são retirados do mercado devido a problemas de eficácia e segurança (BRANCATO *et al*., 2020).

Do total de compostos candidatos a fármacos antineoplásicos que iniciam o processo de desenvolvimento, apenas 5% são aprovados pelas agências regulatórias (HUTCHINSON & KIRK, 2011). De acordo com estudos realizados por Hwang *et al*. (2016), de todos os compostos não aprovados, a maioria (57%) não o é por motivos de falta de eficácia, e outra parcela considerável (17%) por motivos de segurança. Os primeiros ensaios de eficácia e segurança são realizados durante a fase pré-clínica (SINGH *et al*., 2016). Todavia, mais de 90% dos compostos candidatos a fármacos que são aprovados durante a fase pré-clínica não apresentam resultados positivos quanto à eficácia e segurança nos ensaios clínicos subsequentes, e são abolidos do processo de desenvolvimento (VAN DER WORP *et al*., 2010). Esses dados elucidam a incapacidade dos ensaios convencionais empregados na fase pré-clínica de executar a triagem dos compostos de maneira eficiente. A ineficiência desses ensaios, por sua vez, deve-se principalmente à não capacidade dos modelos *in vitro* e *in vivo* empregados em recapitular as principais características do tumor *in vivo* (WARING *et al*., 2015; LANGHANS, 2018). Revela-se, portanto, a necessidade do desenvolvimento de novos modelos pré-clínicos a serem aplicados no processo de desenvolvimento de novos fármacos (HWANG *et al*., 2016), sobretudo para alguns tipos de câncer que urgentemente necessitam do desenvolvimento de novos tratamentos, como o câncer de bexiga.

1.1.1 Câncer de bexiga

O câncer de bexiga é o nono tipo mais comum de câncer no mundo. Só no ano de 2012, estimou-se a ocorrência de 430.000 novos casos no mundo, com o registro de 165.000 mortes (ANTONI *et al*., 2017). As causas do câncer de bexiga nem

sempre são claras para o urologista, e o tumor pode se desenvolver tanto por mutações por meio da ação direta de agentes genotóxicos quanto por danos no epitélio, que impulsionam o processo de proliferação para restauração da barreira urinária, infecções ou irritações prolongadas. Os principais fatores de risco associados ao câncer de bexiga são: o tabagismo (mais alto) (ZEEGERS *et al*., 2000); o uso de corantes capilares (MUNGAN *et al*., 2000); produtos químicos como aminas aromáticas, azocorantes, benzeno e benzidina (SILVERMAN *et al*., 1992); e alguns medicamentos como ciclofosfamida e fenacetina (ORTIZ *et al*., 1992). Várias alterações genéticas têm sido relacionadas ao início do desenvolvimento do câncer de bexiga, e a maioria pode estar associada a mecanismos de bloqueio do *checkpoint* da fase G1/S do ciclo celular (COTE & DATAR, 2003). O desenvolvimento do estágio invasivo muscular tem sido relacionado à perda da função da proteína p53 (KIRSCH & KASTAN, 1998), e o potencial metastático, à perda da função da proteína retinoblastoma (pRb) (POLLACK *et al*., 1997).

Os tumores malignos da bexiga são do tipo sólido, e podem ser classificados em três classes de acordo com a origem: carcinoma de células de transição (inicia nas células do tecido mais interno da bexiga, sendo o mais comum); carcinoma de células escamosas (inicia nas células delgadas e planas); e adenocarcinomas (início nas células glandulares) (INCA, 2017). O grau de invasão segue a classificação geral para outros tumores, como apresentado anteriormente, e o estágio (T) em que o tumor se encontra depende de quais tecidos da bexiga foram invadidos. Quando diagnosticado como não invasivo muscular, pode ser classificado como Ta e Tis (estágio 0), que são os carcinomas papilares e planos não invasivos; ou T1, que são tumores que crescem a partir da camada de células que reveste a bexiga em direção ao tecido conjuntivo logo abaixo, a mucosa, mas não atingem músculo. Se for diagnosticado como invasivo muscular, pode ser classificado como T2 (o tumor cresceu pela mucosa e submucosa, chegando ao tecido muscular); T3 (cresceu em toda a camada muscular da bexiga e no interior da camada de tecidos adiposos adjacentes); e T4 (o tumor se espalhou para além dos tecidos adiposos da bexiga, para outros órgãos e estruturas mais próximas como próstata e vesículas seminais) (KNOWLES, 2008; CHEN *et al*., 2015). Quase 70% dos casos de câncer de bexiga são diagnosticados inicialmente como do tipo T1 não invasivo e de grau baixo, que se encontram ainda na camada interna da bexiga (epitélio transicional), não invadindo camadas mais profundas do tecido muscular (ANTONI *et al*., 2017).

O procedimento padrão de tratamento envolve a cirurgia de ressecção do tumor, seguida por quimioterapia intravenosa ou imunoterapia com a vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (EILFER; SCARPATO; CLARK., 2015), que reduz a recorrência do tumor e diminui a probabilidade de progressão. Quando o tratamento é iniciado em pacientes diagnosticados com tumores de bexiga em estágios iniciais (Ta ou Tis), as chances de o tumor evoluir para um estágio invasivo variam entre 10 e 15%. Porém, se o tumor é diagnosticado em estágios T2 ou superiores, as chances de progredir para um tipo invasivo aumentam para 30% (DALBAGNI, 2007). Além disso, mesmo após 5 anos de tratamento, de 50 a 70% dos pacientes diagnosticados com tumor em estágio T2 ou superior apresentam recidiva, sendo considerada a maior taxa de recorrência registrada entre os tumores sólidos (SYLVESTER *et al*., 2006). O procedimento no caso de recidiva é a remoção total da bexiga (cistectomia), o que pode causar grandes impactos na qualidade de vida do paciente (BABJUK *et al*., 2013). A progressão do tumor de bexiga e a alta recidiva estão associadas à metástase tumoral e à resistência dessas células aos fármacos convencionais utilizados (KNOWLES, 2008), sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos mais eficazes para tratar, principalmente, os pacientes diagnosticados em estágios iniciais e evitar a progressão para um estágio mais invasivo (SASAKI *et al*., 2017).

As pesquisas que envolvem a descoberta de novos compostos para o tratamento do câncer de bexiga são particularmente dificultadas devido à utilização de modelos pré-clínicos que não recapitulam com precisão aspectos fisiopatológicos do tumor de bexiga. Dos compostos candidatos a novos fármacos para o tratamento do câncer que são aprovados durante a fase pré-clínica, apenas 5% apresentam resultados positivos quanto a eficácia e segurança nos ensaios clínicos subsequentes (HUTCHINSON & KIRK, 2011). As culturas em monocamada ou bidimensionais (2D) de linhagens celulares de câncer de bexiga (modelo *in vitro*) e os modelos xenográficos (*in vivo*), desenvolvidos com células de linhagens ou primárias de pacientes, são os modelos pré-clínicos convencionais utilizados atualmente no processo de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer de bexiga. Esses modelos têm se mostrado insuficientes para recapitular as características nativas dos tumores de bexiga e predizer de maneira fidedigna a resposta aos compostos testados (CHOI *et al*., 2014).

1.1.2 Modelos pré-clínicos

No processo de desenvolvimento de novos fármacos, os ensaios pré-clínicos envolvem a avaliação da eficácia e segurança de novos compostos em modelos *in vitro* (utilizando células) e *in vivo* (utilizando animais experimentais, ou de laboratório) (DOMCKE *et al*., 2013; GOODSPEED *et al*., 2016). Os estudos iniciais que elucidaram a natureza complexa e os vários estágios de desenvolvimento de diversos tipos de câncer foram realizados em modelos animais. Diversos modelos *in vivo* foram desenvolvidos para investigar as alterações celulares, moleculares e histológicas das neoplasias humanas (DIGIOVANNI, 1992; CURT, 1994). Por essa razão, esses modelos são amplamente utilizados em estudos pré-clínicos para avaliar o potencial terapêutico de novos candidatos a fármacos antineoplásicos. Os animais são capazes de fornecer o microambiente heterogêneo necessário para o desenvolvimento dos tumores, uma vez que podem oferecer uma matriz extracelular (MEC) natural com células estromais e fatores de crescimento, além de um sistema vascularizado (LIU *et al*., 2019). O modelo experimental mais utilizado são os camundongos, devido ao fato de as linhagens serem altamente padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações, além de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos (HANN & BALMAIN, 2001). Os modelos experimentais animais utilizados no estudo do câncer podem ser divididos em quatro categorias: espontâneos, induzidos, geneticamente modificados e transplantados. No primeiro modelo, o desenvolvimento do tumor se dá de maneira natural, por meio, por exemplo, de alterações na dieta. O modelo induzido envolve a utilização de agentes químicos. Já os geneticamente modificados são construídos a partir de edições no genoma desses animais que levam à expressão de oncogenes ou à inibição de genes supressores (OSTRAND - ROSENBERG, 2004). Por fim, os modelos transplantados são os que têm demonstrado maior controle e taxa de sucesso no desenvolvimento do tumor, sendo amplamente aplicados nos ensaios de eficácia de compostos candidatos a fármacos antineoplásicos (SPIRIDON *et al*., 2002; POULIN *et al*., 2015). Os modelos transplantados, ou xenográficos, podem ser gerados por injeção de linhagens de células tumorais humanas ou por transplante de fragmentos do tecido tumoral humano em animais imunodeficientes, o que viabiliza os enxertos de outra espécie.

O modelo xenográfico mais empregado atualmente é o que utiliza fragmentos de tumores provenientes de pacientes (PDX, do inglês, *patient-derived xenografts*) (WILLEY *et al*., 2015; ZHANG *et al*., 2014), que são implantados em linhagens de camundongos imunodeficientes, como Nude, Rag (-) (do inglês, *recombination-activating genes)*, IL2RG (-) (do inglês, i*nterleukin 2 receptor gamma*), scid (do inglês, *severe combined immunodeficiency*), NOD (do inglês, *Non-obese diabetic*) e NSG™(NOD scid gama, JAXCC) (HIDALGO *et al*., 2014). Os tumores que crescem nesses modelos PDX mantêm a heterogeneidade intratumoral, as características histopatológicas, o comportamento metastático e o perfil de expressão gênica (CASSIDY; CALDAS; BRUNA, 2015). Pan *et al*. (2015) mostraram que os modelos PDX de câncer de bexiga retiveram 92 a 97% das alterações genéticas dos pacientes de onde as amostras de tumores se originaram. Esses modelos têm sido utilizados para a seleção personalizada de fármacos e a identificação de mecanismos de resistência (ZENG *et al*., 2017). Os modelos PDX, no entanto, também apresentam algumas desvantagens técnicas, como a disponibilidade de amostra fresca; a necessidade de complexos procedimentos cirúrgicos para garantir um enxerto eficiente; e a baixa taxa de sucesso (PRESTWICH, 2008). A falta de padronização dos protocolos para realização dos enxertos e as variações de um laboratório para outro quanto às condições de manutenção e fator de estresse desses animais levam a baixa eficiência e reprodutibilidade na geração desses modelos (SIOLAS & HANNON, 2013). Normalmente, o estabelecimento do modelo para esses ensaios leva de 2 a 8 meses. No caso de seleção personalizada de fármacos, nesse longo período podem ocorrer, no tumor do paciente, mutações ou processos metastáticos que não estavam presentes na primeira biópsia, dificultando a indicação do quimioterápico com maior probabilidade de sucesso. Muitas vezes, o paciente vem a óbito antes mesmo que se concluam os ensaios nos modelos PDX (MALANEY; NICOSIA; DAVÉ, 2014). O longo tempo de geração desses modelos aliado à baixa taxa de sucesso de enxerto elevam os custos dessa abordagem. Nos Estados Unidos, o custo para um paciente manter um modelo PDX com seu tumor varia de US$ 10.000,00 a US$ 25.000,00 (WILLYARD, 2018).

Mesmo proporcionando um microambiente tumoral heterogêneo com células estromais, sistema vascular e condições biofísicas e bioquímicas para o desenvolvimento dos tumores, os modelos animais possuem também limitações para mimetizar de maneira fidedigna o microambiente do tumor humano, uma vez

que há a substituição dos componentes do estroma humano por elementos murinos (GHEIBI *et al*., 2017; JUNG *et al*., 2017). Além disso, a ausência de células imunes, por se tratar de animais imunodeficientes, e a falta de moléculas de adesão e fatores de crescimento humanos podem alterar a resposta das células aos compostos testados (SHULTZ; ISHIKAWA; GREINER, 2007), levando até mesmo a resultados contrários aos obtidos em ensaios clínicos (KELLAND, 2004; ELLIOTT & YUAN, 2011).

Apesar das limitações quanto a disponibilidade de animais, variabilidade dos procedimentos empregados, alto custo de manutenção e aspectos éticos envolvidos no uso de animais (VAN VLIET, 2014), as agências regulatórias, como a FDA, ainda exigem que sejam realizados os ensaios *in vivo* para a aprovação de um composto (MAK; EVANIEW; CHERT, 2014). No entanto, a falta de padronização nos ensaios *in vivo* leva ao uso indevido desses animais nos ensaios pré-clínicos. Os resultados podem não ser confiáveis e prejudicar o planejamento dos ensaios clínicos. Para mudar esse paradigma e reduzir o número de animais utilizados, tanto as indústrias farmacêuticas quanto os órgãos governamentais têm estudado várias estratégias (BURDEN *et al*., 2015; FLEETWOOD *et al*., 2015). Hoje, qualquer planejamento experimental ou ensaio pré-clínico que envolva animais deve respeitar os princípios dos 3Rs (do inglês, *refine*, *reduce* e *replace*), propostos em 1959 por Russell-Burch (JAROCH; JAROCH; BOJKO, 2018). Devem ser seguidos protocolos que visem a minimizar o número (redução), o sofrimento e o estresse dos animais (refinamento), por meio de um plano racional de experimentos. Isso pode ser alcançado, por exemplo, com uma avaliação cuidadosa dos grupos controles utilizados, do tamanho das amostras, com randomização e análises estatísticas visando reduzir o risco de erros sistemáticos nos experimentos (WÜRBEL, 2017). No caso do terceiro R, referente a substituição, cada vez mais se tem estudado o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisas pré-clínicas. A total substituição de animais por modelos alternativos já é uma realidade em algumas áreas, como no desenvolvimento de cosméticos, por exemplo. No que diz respeito à seleção de compostos candidatos a fármacos com ação antineoplásica, não há ainda modelos alternativos que possam substituir totalmente os modelos animais. Nesse caso, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), órgão governamental ligado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC, Brasília, Brasil), recomenda incisivamente a realização de

ensaios em modelos *in vitro* previamente aos ensaios em modelos *in vivo* (BEISSNER *et al*., 2018), a fim de que se possa realizar uma primeira triagem dos compostos candidatos, diminuindo, assim, o uso de animais.

Pelas razões acima citadas, os modelos *in vitro* têm atualmente um papel de destaque para o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Desde que eles permitam selecionar eficientemente os compostos, pode haver redução do uso de animais durante a fase de experimentação pré-clínica e redução do risco de retirada do fármaco do mercado, evitando desperdício de recursos financeiros pelas indústrias farmacêuticas (BRANCATO *et al*., 2020). As normas para a realização de ensaios *in vitro* foram pela primeira vez definidas em 1980 pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI, National Cancer Institute, Bethesda, EUA) , com a publicação de um painel de linhagens celulares (NCI60) que apresenta os principais tipos de tumores, como leucemia, melanomas, câncer de colón, de pulmão, do sistema nervoso central, de ovário, mama e próstata. Nesse painel, as células tumorais são mantidas por meio da tecnologia de cultivo bidimensional (2D), em que as células crescem em monocamada aderidas a uma superfície, e os compostos candidatos a fármacos são avaliados quanto ao potencial efeito de inibição do seu crescimento (SHOEMAKER, 2006). Durante as décadas de 1980 e 1990, foram analisados cerca de 10.000 compostos utilizando esse painel, e muitos destes são utilizados hoje como agentes quimioterápicos e imunoterapêuticos (MAYR & BOJANIC, 2009). Esses ensaios levaram à padronização de testes de viabilidade celular que fornecessem respostas rápidas e reprodutíveis nas culturas 2D de células.

A tecnologia de cultivo de células animais pode ser considerada uma revolução no campo da ciência, uma vez que abriu caminho para diversas linhas de pesquisa que buscavam compreender a biologia celular, a morfologia e o desenvolvimento de tecidos, mecanismos de doenças, produção de proteínas e ação de compostos com efeito terapêutico (SANYL, 2014). Como consequência, os modelos *in vitro* com cultura de células já forneceram informações para entender o desenvolvimento de doenças como Parkinson, HIV (do inglês, *human immunodeficiency virus*), diabetes e câncer, bem como o mecanismo de ação de alguns compostos terapêuticos (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013; CHOI *et al*., 2014).

Willhelm Roux, em 1885, foi responsável pelo primeiro isolamento de células provenientes de um embrião de frango (HEAMS, 2012). Em 1951, Dulbecco

desenvolveu um meio de cultura sintético artificial, baseado no meio de cultura utilizado por Eagle, que ficou comumente conhecido como *Dulbeccos's modified Eagle medium* (DMEM) (VERMA, 2012). Também em 1951, Scherer, Syverton e Gey (1953) estabeleceram a primeira linhagem celular derivada de câncer cervical. A partir daí, a técnica de cultivo de células animais tornou-se rotineira em muitos laboratórios. As linhagens celulares de diversos tipos de câncer, que crescem continuamente e possuem alta taxa de proliferação, podendo ser cultivadas por longo período de tempo, podem ser adquiridas em bancos de células comerciais como a *American Type Culture Collection* (ATCC) e o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

Existem hoje disponíveis comercialmente nesses bancos de células diversas linhagens celulares de câncer de bexiga que se originaram de tumores com diferentes graus de invasão. Dentre as linhagens consideradas de grau 1, ou baixo grau de invasão, a linhagem RT4 é a mais utilizada, sendo citada em mais de 13 trabalhos, de acordo com a revisão de Vasyutin *et al*. (2019). As linhagens MGHU3 e SW780 são também exemplos de linhagens de câncer de bexiga de grau 1. De maneira geral, essas células caracterizam-se por serem bem diferenciadas, apresentarem proliferação lenta e possuírem morfologia muito próxima às células normais de bexiga (SANLI *et al*., 2017). As linhagens celulares de grau 2, RT-112 e 5637, são moderadamente diferenciadas e possuem maior risco de invasão muscular, sendo, portanto, consideradas mais agressivas (SANLI *et al*., 2017). As linhagens de grau 3 já são consideradas de alto grau, apresentando morfologias mais anormais e facilmente distinguíveis das células normais de bexiga. São mais agressivas e possuem maior taxa de proliferação, apresentando comportamento metastático com maior frequência (KITAMURA & KAKEHI, 2015). As linhagens HT1376, J82 e T24 são exemplos de células de grau 3, sendo esta última utilizada nos modelos *in vitro* de carcinoma transicional pouco diferenciado. Por fim, as linhagens 253 JP, EJ138, e TCCSUP são linhagens de grau 4 comumente utilizadas em modelos *in vitro* de carcinomas de invasão muscular.

Os ensaios *in vitro* que utilizam tecnologias de cultivo tradicionais 2D são mais simples, rápidos e econômicos, quando comparados aos modelos animais, além de versáteis e reprodutíveis (NIU & WANG, 2015; CHATZINIKOLAIDOU, 2016; AMELIAN *et al*., 2017). Nessa tecnologia, as células crescem aderidas a uma superfície plástica (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013) e interagem com as células

vizinhas de maneira bidimensional (WANG *et al*., 2014). No entanto, a maioria das células em um organismo vivo, inclusive as tumorais, crescem em um microambiente tridimensional (3D). O microambiente 3D é importante, pois o fenótipo e a função de células individuais são fortemente dependentes de interações com proteínas da matriz extracelular (MEC) e com células vizinhas (ABBOTT, 2003). Células cultivadas em condições 2D exibem uma redução significativa nas interações célula-célula e célula-MEC, limitando a capacidade dessas culturas de mimetizar respostas celulares naturais *in vitro* (LEE *et al*., 2009).

As interações célula-MEC são importantes, uma vez que as células se comunicam com o microambiente celular em que estão inseridas, recebendo constantemente estímulos por meio de: (i) fatores solúveis no fluido intersticial; (ii) adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular; ou (iii) forças mecânicas. Os sinais são transmitidos para o interior das células, induzindo uma cascata de eventos interativos em vários níveis. Os eventos moleculares podem incluir mudanças na expressão gênica, fosforilação e desfosforilação de proteínas e trocas moleculares entre os espaços intra e extracelular. Mudanças na endocitose/exocitose, remodelamento do citoesqueleto e deformação nuclear podem ocorrer no nível subcelular. No nível celular, por sua vez, os estímulos ambientais podem causar mudanças na morfologia e mobilidade celular, influenciar a proliferação, diferenciação, apoptose, metabolismo e outras funções (SOUCY & ROMER, 2009; DISCHER *et al*., 2009; ENGLER *et al*., 2006; ELLIOT & YUAN, 2011; BAKER & CHEN, 2012; HICKMAN *et al*., 2014).

As condições 2D também podem afetar a morfologia das células em cultura, afetando, assim, suas funções, organização de estruturas internas, secreção de proteínas da MEC e sinalização celular (MAHMUD *et al*., 2009;). Devido à ausência de interações com o microambiente externo, as células também perdem a sua polaridade, isto é, diferenças espaciais na forma, estrutura e função, bem como na localização de organelas em seu interior, levando a mudanças nas respostas a vários fenômenos, como a apoptose (MSEKA; BAMBURG; CRAMEL, 2007). No tumor *in vivo*, conforme será discutido a seguir, a disponibilidade de nutrientes, gases, metabólicos e moléculas sinalizadoras às células varia dependendo da massa do tumor e organização das células (PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007). Células localizadas em diferentes regiões do tumor podem apresentar comportamentos e fenótipos diferentes, caracterizando a heterogeneidade celular

dos tumores sólidos (GILBERT *et al*., 2010). Essa heterogeneidade celular não é frequentemente observada nas culturas em monocamada, uma vez que as células possuem o mesmo acesso aos compostos e moléculas disponíveis no meio de cultura.

Da mesma forma que os estímulos externos afetam drasticamente as propriedades, o comportamento e as funções das células, eles podem afetar também a resposta das células aos compostos que estão sendo testados (QUAIL & JOYCE, 2013; SMITH & KANG, 2013; YULYANA *et al*., 2015). Portanto, apesar de fornecerem importantes e valiosas informações e serem amplamente utilizados, ensaios baseados em cultivos 2D não predizem de maneira precisa a eficácia e citotoxicidade *in vivo*, como também outros efeitos biológicos (SANTO *et al*., 2016). Uma vez que as principais características dos tumores sólidos *in vivo* não são reproduzidas nos modelos tradicionais 2D, um grande número de compostos que possuem eficiência e segurança inadequadas não são corretamente identificados na fase pré-clínica e seguem para os ensaios *in vivo*, aumentando o tempo e custo do processo, e também contribuindo para o uso excessivo de animais (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013; DOKE & DHAWALE, 2015; MENSHYKAU, 2017). Nesse contexto, emerge a necessidade de modelos *in vitro* com maior capacidade preditiva, tanto na academia quanto na indústria farmacêutica (WARING *et al*., 2015).

Novas tecnologias de cultivo *in vitro* e modelos *in silico* vêm sendo hoje estudados a fim de contornar as limitações citadas acima (CARVALHO *et al*., 2015; KONSTORUM *et al*., 2017). Os modelos *in silico* baseiam-se em modelos computacionais e equações matemáticas, que são utilizados para prever o progresso do tumor, heterogeneidade e efeitos terapêuticos sem a necessidade de realizar experimentos em laboratório (KONSTORUM *et al*., 2017). Alguns estudos mostram concordância destes com experimentos realizados em modelos *in vivo* (PALLADINI *et al*., 2010). As vantagens dessa abordagem são o alto controle dos parâmetros e a alta eficiência, no entanto, a alta complexidade da fisiologia dos tumores ainda dificulta a construção de modelos computacionais heterogêneos, e o conhecimento insuficiente dos mecanismos da tumorigênese pode resultar em modelagens inadequadas (LIU *et al*., 2019). Muitos trabalhos têm focado na melhora dos parâmetros de robustez dos modelos *in silico* que possuem potencial para revolucionar no futuro a maneira como os ensaios biológicos são realizados. No que

tange às novas tecnologias de cultivo *in vitro*, o cultivo tridimensional (3D) emerge como um modelo promissor para seleção de novos candidatos à terapia do câncer, uma vez que é capaz de recapitular, dentre outras características, a arquitetura 3D do microambiente onde as células tumorais crescem (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013; FENNEMA *et al*., 2013; ZIMMERMANN *et al*., 2013; NUNES *et al*., 2019). As vantagens dessa tecnologia de cultivo serão discutidas em mais detalhes a seguir.

A existência de um modelo pré-clínico perfeito, capaz de unir todas as características essenciais para mimetização do organismo nativo, ainda não é uma realidade. Cada modelo possui suas vantagens e limitações (resumidas na Tabela 1), e sua aplicabilidade dependerá do objetivo a ser alcançado. Nas três últimas décadas, um dos principais dilemas da indústria farmacêutica foi a busca por modelos pré-clínicos que pudessem ser compatíveis com os ensaios de alto desempenho (HTS, do inglês, *High throughput screening*). Os ensaios HTS ganharam popularidade nos últimos anos e se tornaram o método padrão nas indústrias que realizam processos de descoberta de novos fármacos. Essa abordagem permite avaliar nos modelos pré-clínicos a atividade de um grande número de compostos em um curto período de tempo por meio do uso de processos automatizados e análise de dados em larga escala (MARTIN *et al*., 2011). Essa abordagem pode ser aplicada na triagem de diferentes tipos de bibliotecas, incluindo química combinatória, genômica, proteínas e peptídeos, acelerando a descoberta de novos fármacos e reduzindo os custos do processo. Para serem compatíveis com os ensaios HTS, os modelos pré-clínicos devem ser passíveis de miniaturização, escalonáveis e reprodutíveis (SZYMANSKI; MARKOWICZ; MIKICIUK-OLASIK, 2012).

Tabela 1 – Principais vantagens e desvantagens dos modelos pré-clínicos utilizados no processo de descobrimento de novos fármacos

Modelos	Vantagens	Desvantagens
In vivo[1]	• Métodos padronizados; • Microambiente heterogêneo; • Presença de MEC com células estromais e fatores de crescimento; • Presença de vascularização; • Manutenção do perfil de expressão gênica; • Variedade de ferramentas e protocolos analíticos disponíveis.	• Presença de componentes do estroma murino em vez de humano; • Ausência de células do sistema imune, no caso de camundongos imunodeficientes; • Técnica demorada e complexa, baixa taxa de sucesso; • Alto custo; • Baixa reprodutibilidade; • Limitações éticas; • Impossibilidade de ser aplicado em ensaios HTS.
In vitro – 2D[2]	• Independência do uso de animais; • Técnicas de cultivo simples e rápidas; • Baixo custo; • Fácil monitoramento; • Boa reprodutibilidade; • Variedade de ferramentas e protocolos analíticos disponíveis; • Possibilidade de ser aplicado em ensaios HTS.	• Não mimetização da estrutura 3D do tumor; • Alteração da morfologia da célula; • Reduzida interação célula-célula; • Reduzida interação célula-MEC; • Perda de polaridade celular; • Alteração da *performance* de crescimento e do metabolismo celular; • Distribuição homogênea de nutrientes e O_2 entre as células; • Ausência de heterogeneidade celular; • Alteração do perfil de expressão gênica.
In vitro – 3D[3]	• Independência do uso de animais; • Recapitulação da arquitetura 3D do microambiente tumoral nativo; • Preservação da morfologia das células; • *Performance* de crescimento e metabolismo celular mais próximo do nativo; • Perfil de expressão gênica mais próximo do *in vivo*; • Possibilidade de ser aplicado em ensaios HTS.	• Exigência de técnicas de cultivo mais complexas e custosas que 2D; • Técnica de cultivo mais demorada; • Ausência de padronização dos protocolos de cultivo; • Dificuldade no monitoramento das culturas; • Baixa variedade de ferramentas e protocolos analíticos disponíveis.
In silico[4]	• Independência do uso de animais e células; • Sem necessidade de síntese ou preparação dos compostos a serem testados; • Sem necessidade de alta infraestrutura laboratorial; • Alto controle dos parâmetros; • Alta eficiência; • Tempo reduzido de execução; • Baixo custo; • Alta aplicabilidade em ensaios HTS	• Não fornecimento de um resultado proveniente de um ensaio experimental, apenas predições; • Limitado: depende da disponibilidade de dados experimentais para modelagem; • Baixa robustez devido à alta incidência de modelagens inadequadas; • Exigência de *softwares* especiais para análise dos resultados; • Não reprodução da complexidade tumoral.

[1] Prestwich, 2008; Siolas e Hannon, 2013; Mak; Evaniew; Chert, 2014; van Vliet, 2014; Goodspeed *et al*., 2016; Gheibi *et al*., 2017; Beissner *et al*., 2018; Liu *et al*., 2019.
[2] Mahmud *et al*., 2009; Niu e Wang, 2015; Chatzinikolaidou, 2016; Amelian *et al*., 2017.
[3] Breslin e O'Driscoll, 2013; Fennema *et al*., 2013; Zimmermann *et al*., 2013; Edmondson *et al*., 2014; Nunes *et al*., 2019.
[4] Benfenati *et al*., 2010; Palladini *et al*., 2010; Konstorum *et al*., 2017; Liu *et al*., 2019.

1.2 TECNOLOGIA DE CULTIVOS TRIDIMENSIONAIS (3D)

Hamburger e Salmon (1977) foram os primeiros autores a reportar uma cultura 3D utilizando solução de ágar e células-tronco tumorais (CTTs) humanas. A partir daí, diversos trabalhos começaram a mostrar as semelhanças entre células cultivadas em condições 3D e células que crescem em massas tumorais sólidas (MAZZOLENI; DI LORENZO; STEIMBERG, 2009). Hoje tem-se registro da aplicação das culturas 3D não só na pesquisa oncológica, mas também em outras áreas, como na engenharia de tecidos. As células cultivadas em condições 3D apresentam melhores propriedades regenerativas quando comparadas com abordagens fundamentadas em cultivos em 2D, sendo capazes de mimetizar a organização multicelular 3D típica dos tecidos formadores de órgãos (MURPHY & ATALA, 2014; LASCHKE & MENGER, 2017a). As culturas 3D também estão sendo utilizadas como modelos para estudar as condições fisiológicas de diversos tecidos e órgãos, como, por exemplo, as propriedades anticoagulantes e anti-inflamatórias de células endoteliais que, ao serem cultivadas em condições 3D, apresentam a relação superfície-volume celular aumentada, mimetizando as condições naturais (SFRISO & RIEBEN, 2020). Estudos de neurodesenvolvimento e doenças neurodegenerativas têm sido realizados em células-tronco neurais humanas (hNSC, do inglês *neural stem cell*) diferenciadas cultivadas em condições 3D (SIMÃO *et al*., 2016). Quando comparados a modelos *in vitro* 2D convencionais, os cultivos 3D de células hepáticas se apresentam como um modelo preditivo para estudos a longo prazo de toxicidade induzida por fármacos (BELL *et al*., 2018), uma vez que reproduzem características funcionais típicas do tecido nativo, como a atividade dos citocromos P450, P2B6 e P2C9 (RAMACHANDRAN *et al*., 2015).

Na área oncológica, a tecnologia de cultivo 3D tem como foco possibilitar que as células tumorais recapitulem as principais características físicas e bioquímicas dos tumores nativos. Os cultivos 3D de células tumorais podem então ser utilizados nos estudos dos processos de tumorigênese, migração celular, metástase e na investigação de diferentes abordagens de tratamento, como quimioterapia, sistemas de entrega de fármacos, terapias gênicas e com vírus oncolíticos, imunoterapia, terapias fotodinâmicas e fototerapia, terapia fototermal e radioterapia (revisado por NUNES *et al*., 2019). Em especial, no caso de modelos *in vitro* 3D que procuram recapitular a estrutura de tumores sólidos, as técnicas de cultivo são direcionadas

para a formação de agregados celulares compactos denominados esferoides ou organoides tumorais (KAPATCZYNSKA *et al*., 2018). Células dispersas em hidrogéis e aglomerados celulares não compactos, com fraca adesão entre as células e fáceis de serem dissociados, podem ser consideradas culturas 3D, mas não são classificadas como esferoides (MOSHKSAYAN *et al*., 2018). A organização e compactação dessas células nos esferoides são elementos essenciais para que esses agregados apresentem as características análogas ao tumor sólido *in vivo* (HIRSCHHAEUSER *et al*., 2010; MEHTA *et al*., 2012; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

1.2.1 Cultivo 3D de células tumorais

As estruturas esféricas 3D formadas pelo agrupamento das células tumorais são referidas na literatura com diferentes nomenclaturas dependendo do tipo ou origem das células utilizadas no cultivo. Agregados celulares formados por linhagens celulares, de um ou mais tipos celulares diferentes, são comumente denominados esferoides tumorais multicelulares (MTS, do inglês, *multicelular tumor spheroids)* ou simplesmente esferoides (SUTHERLAND; MCCREDIE; INCH, 1971). Kenny *et al*. (2007), ao analisarem a estrutura de esferoides formados por 25 diferentes linhagens de câncer de mama, classificaram-nos em quatro grupos: *round*, *mass*, *grape-like* e *stellate*. Os esferoides de forma *round* possuem forte adesão entre as células, formam agregados arredondados, e os núcleos das células se organizam de maneira regular em torno do centro do esferoide. Os esferoides de forma *mass* também apresentam forma arredondada com forte adesão entre as células, mas com núcleo das células desorganizado. Os esferoides com forma *grape-like* e *stellate*, por sua vez, apresentam fraca adesão entre as células com núcleo desorganizado. A diferença é que, nos de forma *stellate*, as células nos agregados apresentam forma mais alongada, de maneira semelhante ao comportamento de uma célula tumoral invasiva.

Os modelos *in vitro* tradicionalmente utilizados em estudos pré-clínicos são baseados em culturas de linhagens celulares tumorais comerciais. Apesar de serem facilmente cultiváveis, as linhagens celulares tumorais são muito diferentes das células tumorais originais e podem apresentar alterações genômicas e proteômicas devido ao longo tempo de cultivo (GILLET; VARMA; GOTTESMAN, 2013). As

culturas 3D utilizando células tumorais primárias têm sido o foco de muitos trabalhos recentes (GRUNDY *et al*., 2016; XIE & WU, 2016; AHONEN *et al*., 2017; GHEIBI *et al*., 2017), sendo capazes de recapitular de maneira mais efetiva aspectos encontrados no microambiente do tumor nativo, como interações célula-célula e célula-MEC e propriedades mecânicas (BENIEN & SWAMI, 2014). As culturas 3D com células primárias podem ser geradas a partir da propagação *in vitro* das células tumorais isoladas de amostras de biópsia ou do cultivo de CTTs isoladas dessas amostras (BROUTIER *et al*., 2017). Quando se utilizam CTTs, os cultivos 3D são comumente referidos na literatura como cultura de organoides ou organoides tumorais derivados de paciente (PDO, do inglês, *patient-derived tumor organoid*). O advento dos cultivos de organoides tumorais tem despertado interesse da comunidade científica, uma vez que são capazes de reproduzir a heterogeneidade celular e molecular dos tumores, sendo uma ferramenta essencial para estudos de casos raros de câncer que não possuem linhagens celulares disponíveis (LANCASTER & KNOBLICH, 2014; CLEVERS, 2016). Ao utilizar-se de células tumorais isoladas de amostras de biópsia, as culturas 3D são referidas como esferoides tumorais derivados de pacientes (PDS, do inglês, *patient-derived tumor spheroids)* (MIYOSHI *et al*., 2018; SONG *et al*., 2018; ZHANG *et al*., 2018). Por serem formados por células tumorais diferenciadas, os PDSs possuem uma capacidade reduzida de recapitular a heterogeneidade dos tumores quando comparados aos PDOs (BORRETTO *et al*., 2019).

Tanto os PDOs quanto os PDSs podem ser aplicados em ensaios personalizados de triagem de fármacos (STADLER *et al*., 2015; NATH & DEVI, 2016; PAULI *et al*., 2017; WEEBER *et al*., 2017). A abordagem atual de tratamento "*one-size-fits-all*", isto é, pacientes com o mesmo tipo de câncer recebem o mesmo tratamento, não é mais considerada a melhor estratégia terapêutica, pois não leva em conta a variabilidade genética individual de cada paciente, o que, por sua vez, tem uma influência potencial na análise de resposta ao tratamento (ABOULKHEYR *et al*., 2018). O instituto Hubrecht Organoid Technology (HUB, Utrecht, Holanda), por exemplo, lidera hoje um grande estudo que compara a resposta dos PDOs de mama, colón e pulmão ao tratamento com fármacos antineoplásicos com a resposta clínica do paciente, relatando correlação positiva entre os dois modelos (ABOULKHEYR *et al*., 2018; SACHS *et al*., 2018;).

Em relação ao câncer de bexiga, trabalhos envolvendo PDOs e PDSs

destacam a importância da heterogeneidade genética nesses modelos nos ensaios com os fármacos antineoplásicos ao comparar a resposta destes com os resultados obtidos em modelos PDX e avaliar a correlação entre eles (LEE *et al*., 2018a). Outros autores descreveram em seus trabalhos diferentes técnicas para geração de organoides tumorais de bexiga de diferentes graus de invasão (BURGUÉS *et al*., 2007; BENTIVEGNA *et al*. 2010; INGRAM *et al*., 2010; PALMER *et al*., 2016). No entanto, a técnica de cultivo dos PDOs e PDSs apresenta vários desafios, dentre eles, a baixa disponibilidade de amostra vinda das biópsias, técnicas laboriosas de isolamento das células tumorais de componentes do estroma, alto custo dos meios de cultura (RINGUETTE-GOULET; BOLDUC; POULIOT, 2018) e complexas condições de manutenção dessas culturas, uma vez que necessitam de fatores de crescimento externos, como o fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês, *epidermal growth factor*) e as proteínas Wnt3A, R-spondin-1 e Noggin, e uma MEC exógena para promover a organização 3D (SHAH; SINGH, 2017). Uma possível abordagem para solucionar a limitada disponibilidade de amostras consiste em utilizar os modelos *in vivo* PDX para expandir os fragmentos tumorais coletados nas biópsias antes dos cultivos *in vitro.* Dessa maneira, tem-se material para o cultivo suficiente dos PDSs a serem utilizados nos ensaios de eficácia terapêutica (YOSHIDA, 2020).

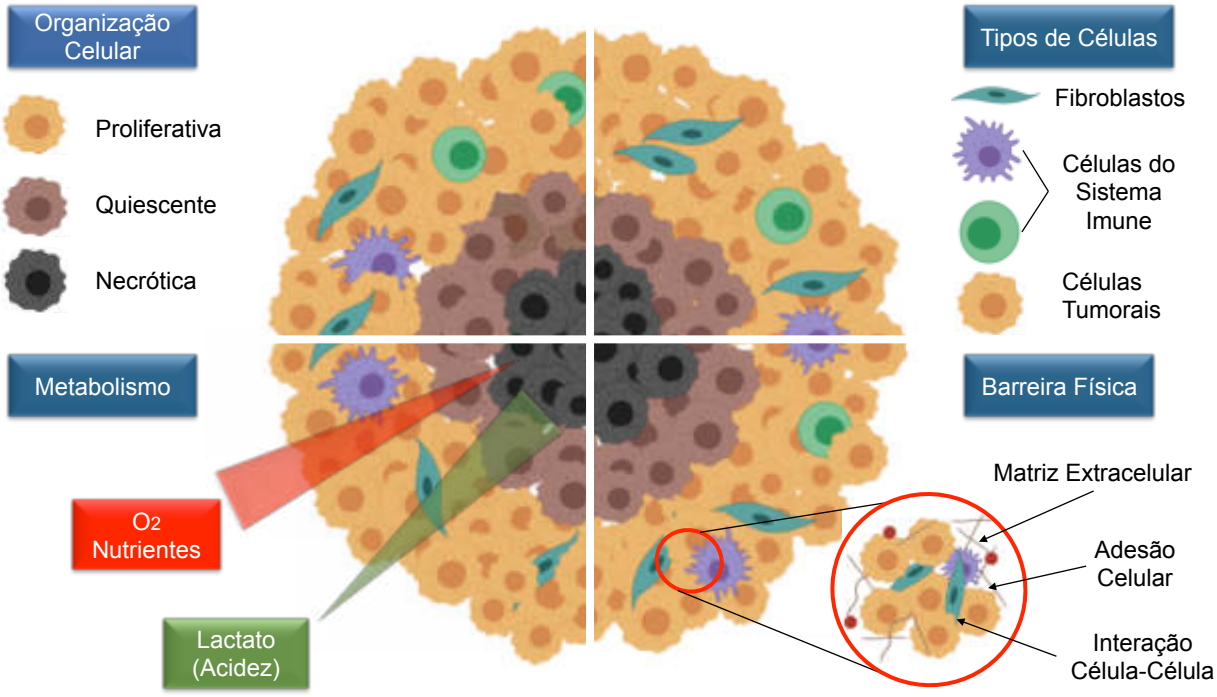
1.2.2 Características dos esferoides tumorais

Simplificadamente, o desenvolvimento dos tumores sólidos pode ser dividido em dois estágios. Em um primeiro momento, na fase inicial, as células estão em constante crescimento, portanto, observa-se aumento no tamanho e volume da massa tumoral (WARD & KING, 1997). O crescimento do tumor é mantido até que dê início à formação de vasos induzidos pela secreção de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth fcator*) e angiogenina (ANG), e pelo remodelamento da MEC mediado pelas proteases MMP (do inglês, *matrix metalloproteinase*) 2 e 9, como já discutido (VAN DIJK; GÖRANSSON; STRÖMBLAND, 2013). A partir desse momento, as células adquirem propriedades invasivas, e o processo de metástase é iniciado. Um perfil de crescimento semelhante foi observado nos cultivos na forma de esferoides: um aumento no tamanho desses agregados durante o estágio inicial,

atingindo até 500 µm de diâmetro, seguido por um queda na taxa de crescimento até que o tamanho fique constante (platô no gráfico de crescimento) (BYRNE, 2010; COSTA *et al*., 2014). Esse perfil de crescimento na fase inicial é essencial para que se estabeleça a organização em camadas das células nos esferoides (WARD & KING, 1997). Como nos modelos *in vitro* 3D mais simples não se tem a formação de vasos, os esferoides não avançam para a segunda fase de desenvolvimento. Por essa razão, os modelos *in vitro* de esferoides tumorais são comumente utilizados para estudos de tumores sólidos em fase inicial.

As principais características dos tumores sólidos recapituladas nos esferoides foram ilustradas na Figura 1.

Figura 1. Principais características dos tumores sólidos *in vivo* e esferoides tumorais *in vitro*



Representação esquemática das principais características dos tumores sólidos recapituladas nos esferoides. 1) Organização celular: as células tumorais encontram-se organizadas em três principais camadas. Na cama mais externa encontram-se as células tumorais proliferativas (alaranjadas); na cama intermediária, as células tumorais quiescentes (amarronzadas); e na camada mais interna, células necróticas (pretas). 2) Tipos de células: os esferoides podem ser formados não só por células tumorais, mas também por células do sistema imune (arroxeadas e esverdeadas arredondadas) e fibroblastos (esverdeadas e achatadas). 3) Barreira física: as fortes interações células-células, a deposição de componentes da MEC e a interação das células com esses componentes dificultam a difusão de gases e nutrientes. 4) Metabolismo: a limitação de oxigênio gera uma região de hipóxia no interior dos esferoides. A alta produção de lactato leva a uma diminuição do pH na região interna.
Fonte: autoria própria, baseado em Costa *et al*., 2016.

O arranjo e posicionamento das células nos tumores sólidos possibilita um aumento das interações entre elas, sendo as E-caderinas presentes na superfície das membranas celulares as protagonistas desse fenômeno (JEANES; GOTTARDI; YAP, 2008). Em esferoides de tumores hepático, renal, de mama e próstata, foi observado que a presença das E-caderinas é essencial para a geração dessa forte coesão celular, possibilitando a formação do agregado (ALPAUGH *et al*., 2002; ENMON *et al*., 2002; SHIMAZUI *et al*., 2004; TAKEI *et al*., 2005). Além disso, diversos trabalhos mostram que a expressão de E-caderinas nos esferoides é maior do que nas culturas 2D, evidenciando a capacidade das culturas 3D de recapitular de maneira mais fidedigna as características dos tumores sólidos. Em esferoides tanto de células de câncer de ovário quanto de carcinoma de fígado, a expressão de E-caderinas foi maior quando comparados às células cultivadas em 2D (XU; FARACH-CARSON; JIA, 2014; JUNG *et al*., 2017). Essas fortes interações célula-célula influenciam diversos comportamentos celulares, desde cascatas de sinalização até sobrevivência e proliferação.

Não só a interação célula-célula é importante nos tumores sólidos, mas também a comunicação entre as células e a MEC. Receptores importantes na superfície da célula, como as integrinas, interagem com proteínas da MEC e podem ativar vias de sinalização intracelular para proliferação, diferenciação e sobrevivência do tumor (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014; XIONG & XU, 2016). Em todos os tecidos, a MEC fornece suporte para crescimento e organização das células, no entanto, nos tumores ela tem um papel fundamental, uma vez que as alterações que ocorrem durante a carcinogênese afetam o desenvolvimento do tumor. Estudos mostram um aumento na deposição de algumas proteínas como colágeno e fibronectina durante o desenvolvimento tumoral (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014; XIONG & XU, 2016). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, as células do sistema imunológico são capazes de suprimir a proliferação das células tumorais. No entanto, é nesse momento que pode haver um remodelamento da MEC, através do aumento na deposição das proteínas citadas, que causam alterações fenotípicas das células estromais, e estas passam a promover a sobrevivência do tumor. Com o crescimento descontrolado e o remodelamento da MEC, as células tumorais são capazes, então, de escapar da ação do sistema imune (LIU *et al*., 2019).

Exemplos da influência da MEC no comportamento das células tumorais

foram descritos por Frisch *et al*. (1996) e Gilmore *et al*. (2000), que mostram que a forte adesão das células à MEC leva a um aumento da ativação da via de sinalização pelas integrinas, o que pode suprimir a apoptose induzida por p53 e induzir a expressão de vários genes antiapoptóticos, como o *BCL-2* (do inglês, *B-cell lymphoma 2*), favorecendo a sobrevivência das células tumorais. Esse perfil de expressão aumentada de proteínas da MEC também foi observado em esferoides de câncer de tireoide (linhagem U-118 MG) e de glioma (HTH-7), que foram capazes de produzir colágeno dos tipo I, III e V, fibronectina e laminina (NEDERMAN *et al*., 1984). A expressão dessas proteínas da MEC é maior nas culturas de esferoides quando comparadas a culturas 2D (BJERKVIG; LAERUM; RUCKLIDGE, 1989).

Como elucidado anteriormente, nas culturas 3D com células de tumores sólidos, busca-se a geração de esferoides compactos. Quanto mais compactos, mais limitada é a penetração de nutrientes e gases para as camadas interiores, formando uma verdadeira barreira física. Essa barreira é observada nos tumores sólidos *in vivo*, uma vez que a deposição das proteínas da MEC e as interações célula-MEC e célula-célula aumentam a densidade do tecido e a pressão do fluido intersticial (PFI), o que dificulta o transporte de massa (MINCHINTON & TANNOCK, 2006; COSTA *et al*., 2016). Dessa maneira, gera-se um gradiente de oxigênio, em que as células da camada externa do tumor têm mais acesso a esse gás do que as células mais internas, desenvolvendo uma região de hipóxia (revisado por LANGHANS, 2018; NUNES *et al*., 2019). Mesmo nos tumores *in vivo* vascularizados, a distância entre os vasos e a região interna do tumor é frequentemente grande o bastante para permitir o desenvolvimento dessa região de hipóxia (a partir de 100 µm de comprimento) (HÖCKEL & VAUPEL, 2001). O gradiente de oxigênio é observado em esferoides de diferentes linhagens celulares. Trabalhos mostram a relação proporcionalmente inversa entre a difusão desse gás e o aumento de tamanho desses esferoides. Quanto maiores os esferoides, mais notório o núcleo hipóxico (GRIMES; FLETCHER; PARTRIDGE, 2014). A formação de uma região com reduzida disponibilidade de oxigênio é uma característica importante dos tumores sólidos, uma vez que as células presentes nessa região expressam fatores induzíveis por hipóxia (HIF, do inglês, *hypoxia-inducible factors*), que, por sua vez, estão associados a mecanismos de resistência terapêutica (ROHWER & CRAMER, 2011). Shin *et al*. (2015) mostraram uma relação entre o aumento da hipóxia e o aumento da atividade de migração do tumor e da metalloproteinase-1 (MMP1), uma

proteína da matriz que promove angiogênese, invasão e metástase em doenças musculares invasivas, em esferoides de câncer de bexiga. Esse trabalho mostra que a regulação da oxirredução da MMP é uma via importante no processo metastático do tumor de bexiga.

A reduzida disponibilidade de oxigênio nas camadas mais internas dos tumores também causará alterações no metabolismo dessas células, que passarão a obter energia através de vias anaeróbicas da glicose em vez da via convencional de fosforilação oxidativa mitocondrial (condições normais). Esse fenômeno é chamado de efeito Warburg e tem como subproduto o lactato (HIRSCHHAEUSER; SATTER; MULLER-KLIESER, 2011). Essa alteração metabólica também é observada nos esferoides, uma vez que alguns trabalhos mostraram que a expressão do RNA (do inglês *Ribonucleic Acid*) mensageiro (mRNA) do transportador de glicose 1 (GLUT-1, do inglês *glucose transporter protein isoform 1*), predominante em muitos tipos de câncer, foi maior em esferoides de câncer de pâncreas, mama e glioma (KHAITAN *et al*., 2006; LONGATI *et al*., 2013; PEREIRA *et al*., 2017). Da mesma forma, a expressão da enzima responsável pela produção de lactato, lactato desidrogenase (LDH), foi maior nas culturas 3D em relação às culturas em monocamada. Como as células presentes no núcleo hipóxico dos tumores sólidos apresentam elevada produção de lactato, observa-se a geração de um ambiente mais ácido, com pH entre 6,5 a 7,2 (TRÉDAN *et al*., 2007). Esses valores de pH também contribuem para a resistência dos tumores, uma vez que impactam a eficiência dos fármacos usados (MEHTA *et al*., 2012; WOJTKOWIAK *et al*., 2011). Novamente, essa condição também é reportada em diferentes tipos de esferoides, como nos de câncer de cólon, gliomas e até nos de câncer de bexiga (CARLSSON & ACKER, 1988; SWIETACH *et al*., 2008; HIRSCHHAEUSER *et al*., 2010).

De acordo com as características apresentadas, pode-se segmentar os tumores sólidos em três diferentes camadas, que apresentam células tumorais em diferentes estágios proliferativos. A camada mais interna, como já discutido, é caracterizada pela reduzida disponibilidade de oxigênio e pode apresentar células em estágio de apoptose ou necrose dependendo do tamanho desse tumor e do distanciamento da superfície. Trabalhos mostram que esse núcleo necrótico se desenvolve em esferoides com tamanhos superiores a 500 µm (MEHTA *et al*., 2012; ZIÓŁKOWSKA *et al*., 2013; SANTO *et al*., 2016; FRIEDRICH; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2007). A camada intermediária, onde ainda há disponibilidade

relativa de nutrientes e gases, é uma região mais inativa com células quiescentes (LEE & LEE, 2014). Por fim, a camada mais externa, região proliferativa, se caracteriza pela presença de células que têm maior disponibilidade de oxigênio e nutrientes e, portanto, possuem maior taxa de proliferação (ZIÓŁKOWSKA *et al*., 2013). O controle do tamanho dos esferoides gerados nos modelos *in vitro* é, portanto, um elemento importante a ser considerado. A presença dessas diferentes camadas de células também pode estar associada a mecanismos de resistência dos tumores sólidos. Por exemplo, trabalhos mostram que a resistência observada em esferoides de câncer de pulmão (linhagem INER-37 e INER-51) a alguns fármacos, como a Doxorrubicina (DOX), foi associada à subpopulação de células quiescentes presentes nesses esferoides. Em decorrência da morte das células da camada superficial, devido à ação da DOX, as células quiescentes ficam expostas ao oxigênio e nutrientes, recuperando as atividades proliferativas e promovendo a retomada do crescimento do esferoide (BARRERA-RODRÍGUEZ & FUENTES, 2015).

As células tumorais não só apresentam comportamentos proliferativos diferentes dependendo da região do tumor em que se encontram, como também podem apresentar heterogeneidade genômica entre os subclones. Mesmo se originando de uma população de células monoclonais, a propagação do tumor se dá pela replicação de subclones que podem ser genomicamente distintos. Essas subpopulações de células tumorais podem diferir, por exemplo, com relação a morfologia, cariótipo, capacidade metastática, resposta a fármacos, expressão de proteínas superficiais, receptores, imunogenicidade e sensibilidade à resposta imune (BALDUS *et al*., 2010). O mecanismo de geração dessa heterogeneidade entre os subclones ainda não é compreendido, mas acredita-se que seja resultado do próprio desenvolvimento do tumor. Devido à instabilidade genômica que essas células tumorais apresentam, as mutações ocorrem de maneira randômica em uma célula isolada, e esta pode adquirir vantagem seletiva sobre as demais (DURRETT *et al*., 2011). No caso do câncer de bexiga, essa heterogeneidade interfere nos resultados clínicos, pois pode estar fortemente associada ao quadro de resistência à quimioterapia observada na maioria dos pacientes (DING *et al*., 2012). A heterogeneidade do tumor de bexiga também traz grandes dificuldades para a recente abordagem da terapia direcionada, uma vez que não se sabe quantas alterações genéticas devem ser corrigidas para controlar o tumor.

O tecido tumoral também é composto por outros tipos celulares além das tumorais. Células estromais como adipócitos, fibroblastos (também conhecidos como fibroblastos associados ao câncer ou FAC), células imunes (linfócitos e macrófagos), células endoteliais linfáticas, vasculares e pericitos são exemplos de células que estão presentes nesse microambiente e que influenciam diversos comportamentos do tumor (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMAN, 2012; MEACHAM & MORRISON, 2013; HAM *et al*., 2016). Eventos como angiogênese tumoral, proliferação, invasão e metástase podem ser promovidos pela interação das células tumorais com as células estromais através de sinalizações por citocinas e fatores de crescimento, como interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês *fibroblast growth factors*) (WU & MELODY, 2014; SUN, 2016). Uma das formas de proporcionar nos modelos *in vitro* essa condição envolve a utilização da cocultura 3D. Nessa estratégia, diferentes tipos celulares são cultivados juntos no esferoide em um mesmo ambiente (PASCHOS *et al*., 2015). Essa técnica permite analisar as interações entre as diferentes células como acontece no microambiente tumoral *in vivo* (HENDRIKS; RIESEL; VAN BLITTERSWIJK, 2007). Lamichhane *et al*. (2016) geraram esferoides com células tumorais pulmonares, células endoteliais e células renais embrionárias humanas e observaram um aumento na expressão de proteínas correlacionadas à metástase. Em esferoides de câncer de pâncreas, mama e pulmão cocultivados com fibroblastos, foi observado aumento da secreção de EGF, IL-6 e fator de crescimento de hepatócito (HGF, do inglês, *hepatocity growth factor*) (MAJETY *et al*., 2015). Alguns desses tipos celulares que compõem o microambiente tumoral são foco de pesquisas que buscam novas vias de tratamento para tumores de bexiga, como os FACs e células do sistema imune (CHEN *et al*., 2015).

A organização 3D das células tumorais pode afetar o seu perfil de expressão gênica. Após analisar 179 genes em células de melanoma cultivadas como esferoides e em monocamada, Ghosh *et al*. (2005) mostraram que um grande número de genes foi mais expresso no cultivo 3D. Tais genes estavam associados a eventos essenciais de progressão, invasão e metástase do câncer de pele. Resultados semelhantes foram observados em esferoides de câncer colorretal (LUCA *et al*., 2013), mesotelioma (KIM & PUNG; HO, 2012) e carcinoma hepático (CHANG & HUGHES-FULFORD, 2009). Tais trabalhos evidenciam que o padrão de expressão gênica das culturas 3D se aproxima do observado em tumores sólidos *in*

vivo (CHANG & HUGHES-FULFORD, 2009; GHOSH *et al*., 2005; KIM & PUNG; HO, 2012; SONODA *et al*., 2003). Outros trabalhos mostram que há diferenças entre as culturas 3D e as 2D quanto à expressão de genes associados aos mecanismos de resposta aos fármacos (GURSKI *et al*., 2010; PRICE *et al*., 2012). A estrutura 3D não só pode influenciar na expressão de determinados genes, como também pode levar a diferenças estruturais nos receptores de superfície das células tumorais, causando alterações nas vias de sinalização intracelulares. Quando cultivadas as células em monocamada, os receptores de tirosina quinase das células de câncer de mama da linhagem SKBR-3 apresentaram-se como heterodímeros HER (do inglês human epidermal *growth factor receptor*) tipos 2 e 3. No entanto, quando as células foram submetidas ao cultivo 3D, esses receptores se apresentaram apenas como homodímeros HER2 (PICKL & RIES, 2009).

Por fim, é crescente o número de trabalhos que estudam a presença e as possíveis funções das CTTs, iniciadoras de tumores, no desenvolvimento dos tumores sólidos, assim como sua possível atuação nos mecanismos de resistência. A concepção da presença de células com características tronco em tumores surgiu em 1937 com os trabalhos de Furth e Kahn (1937), que observaram que um novo tumor poderia se iniciar a partir de uma única célula tumoral em camundongos. Desde então, estudos posteriores mostraram o envolvimento das CTTs em diversos processos, como na produção de VEGF, que promove vascularização do tumor em carcinoma espinocelular de camundongos (BECK *et al*., 2011). Devido à sua característica de plasticidade, essas células são capazes de se diferenciar em vários tipos de células que compõem o tumor e estão envolvidas desde no desenvolvimento de novos tumores até no processo de metástase, latência e recorrência local do tumor (ROBERTSON *et al*., 2010; CLEVERS, 2011; FRANCO *et al*., 2016). Essas células apresentam capacidade ilimitada de autorrenovação e potencial de diferenciação (TIRINO *et al*., 2013) e também estão envolvidas diretamente com o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (TEM), em que células epiteliais adquirem propriedades mesenquimais apresentando maior mobilidade, o que resulta na progressão e metástase dos tumores (KALLURI & WEINBERG, 2009). Ademais, trabalhos desvendam uma relação direta entre o microambiente hipóxico criado nos tumores sólidos e a promoção de propriedades de plasticidade dessas células (WANG *et al*., 2011).

Quanto aos modelos 3D *in vitro*, a presença de células CTT tem sido observada com maior frequência nos organoides tumorais após marcação com anticorpos anti-CD44 e anti-CD133 (TODARO *et al*., 2007). No entanto, há trabalhos que mostram a presença de CTTs em esferoides gerados com linhagens celulares (GU *et al*., 2012; BHUVANALAKSHMI *et al*., 2015; FRANCO *et al*., 2016). A existência de CTTs nos tumores de bexiga foi descrita há algum tempo em estudos utilizando as linhagens celulares T24 e UM-UC-3, consideradas mais tumorigênicas (OJHA *et al*., 2014). Mais tarde, Peek *et al*. (2012) encontraram altas expressões de CD44 e CD49 em esferoides de tumor de bexiga gerado com outras linhagens.

1.2.3 Resistência dos esferoides a fármacos antineoplásicos

Pacientes com câncer de bexiga apresentam com frequência recidiva da doença após alguns anos do início do tratamento. Essa falha tem sido atribuída à quimiorresistência dos tumores aos tratamentos disponíveis (CHEN *et al*., 2015). Há duas hipóteses que tentam explicar a resistência no câncer de bexiga. A primeira hipótese está relacionada à heterogeneidade entre as células tumorais, discutida anteriormente. Após o tratamento, os clones mais sensíveis são eliminados, mas os clones resistentes, que possuem mutações de resistência, são selecionados e passam a ser dominantes. Já na segunda hipótese, a resistência evolui de maneira progressiva, com acúmulo sequencial de mutações, que vão conferindo ao tumor maior resistência (COOKE *et al*., 2010). A resistência aos tratamentos não é realidade só nos tumores de bexiga, já que muitos outros tipos de câncer podem desenvolver resistência aos fármacos no início do tratamento ou após várias administrações, levando à diminuição da eficácia terapêutica (HOUSMAN *et al*., 2014). Nesse sentido, tem-se investido no desenvolvimento de compostos terapêuticos mais eficazes, destinados a combater a resistência às terapias nos tumores sólidos (BARNES *et al*., 2017; NERVI; MARINIS; CODACCI-PISANELLI, 2015)

Como discutido anteriormente, uma das características dos tumores sólidos é a presença de um ambiente hipóxico e, por consequência, uma superexpressão de HIF. Estudos com esferoides tumorais mostram que a expressão desses fatores contribui para o estabelecimento de vários mecanismos de resistência terapêutica (ROHWER & CRAMER, 2011). Um exemplo é a regulação positiva do gene

envolvido no mecanismo de resistência a múltiplas drogas *MDR-1* (do inglês, *multiple drug resistance gene*). Esse gene codifica a glicoproteína de membrana P (P-gp) que exporta ativamente moléculas, como os fármacos, para o exterior da célula, resultando em uma redução na absorção do composto. Estudos mostram que, quando submetidas à condição de hipóxia, as células tumorais podem superexpressar a MDR-1/P-glicoproteína e, por consequência, levar a um aumento na resistência a alguns fármacos antineoplásicos (LI *et al*., 2016). O HIF também pode influenciar a expressão de *VEGF*, que também está envolvido em mecanismos de resistência a fármacos (KROCK; SKULI; SIMON, 2011), e é altamente expresso nas regiões hipóxicas dos esferoides (GONG *et al*., 2015; QIN *et al*., 2016). Também já foi mencionado que as células tumorais podem apresentar superexpressão de vários fatores antiapoptóticos como p-53, p-21, Bcl-2, Bak (do inglês, *Bcl-2 homologous antagonist/killer*), Bax (do inglês, *BCL2 Associated X*), Bcl-xL (do inglês, *B-cell lymphoma 2-extra large*), Bid (do inglês, *BH3 interacting-domain death agonist*), Mcl-1 (do inglês, *Myeloid cell leukemia-1*), NF-kB (do inglês, *nuclear factor kappa B*) e survivina. Relatos na literatura também associam ao HIF a regulação da expressão desses genes (MASOUD & LI, 2015; ROHWER & CRAMER, 2011). Por exemplo, a resistência de células de glioma da linhagem BMG-1 cultivadas na forma de esferoides ao tratamento com fármacos antineoplásicos foi associada à superexpressão de *HIF-1α*, *BAX* e *BCL* (KHAITAN *et al*., 2006).

A associação entre o ambiente hipóxico e a resistência a alguns fármacos não está relacionada apenas à regulação da expressão de alguns genes, mas também a impossibilidades de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à ausência de oxigênio. O efeito terapêutico de alguns fármacos, como 5-fluorouracil, Cisplatina, DOX e Irinotecano, está relacionado à formação desses EROs que danificarão a membrana celular e o DNA (do inglês *Deoxyribonucleic acid*) das células tumorais (DEAVALL *et al*., 2012; WIGERUP; PAHLMAN; BEXELL, 2016). Uma produção limitada de EROs foi observada em esferoides de tumor de próstata DU-145 que apresentavam valores reduzidos de pressão de oxigênio (WARTENBERG *et al*., 2003). A ausência de formação de EROs também influencia a resposta dos tumores à radiação. As quebras simples e duplas no DNA podem ser induzidas tanto pela radiação direta quanto pelos peróxidos que são gerados pela radiólise da água e pelos EROs. Estudos mostram que as quebras induzidas pelos peróxidos são reparadas mais lentamente do que as induzidas pela radiação

(DRIESSENS *et al*., 2009). Portanto, células cancerígenas que recebem menos ou consomem mais oxigênio são tipicamente mais radiorresistentes do que células com alta disponibilidade de oxigênio (GRAY & MILLS, 1953; GRIMES & PARTRIDGE, 2015). Células cultivadas em monocamada acabam sendo mais afetadas pela radiação devido à maior produção de EROs (KHAITAN *et al*., 2006). Outros estudos mostram que o DNA das células tumorais cultivadas na forma de esferoides pode estar mais protegido contra dupla quebra induzida pela radiação devido ao fato de o DNA apresentar um aumento nos níveis de heterocromatização, mostrando que a estrutura 3D pode influenciar na expressão da proteína da heterocromatina 1α (HP1α, do inglês, *heterochromatin protein 1 α*) e em mecanismos de desacetilação da histona H3, dois processos envolvidos na heterocromatização do DNA (STORCH *et al*., 2010).

A identificação e os estudos desse ambiente hipóxico nos tumores levou à estratégia de desenvolvimento de pró-fármacos que apenas se tornam ativos quando sofrem redução química em ambientes de hipóxia, não sendo efetivos em células com disponibilidade normal de oxigênio (MISTRY *et al*., 2017). Como exemplo desses pró-fármacos, pode-se citar o evofosfamida (TH-302), que apresentou um IC_{50} (do inglês *half maximal inhibitory concentration*), que corresponde a concentração de um fármaco capaz de diminuir em 50% a viabilidade celular) muito menor em esferoides de câncer de pulmão H460, sendo, portanto, mais efetivo quando comparado ao IC_{50} obtido nas culturas em monocamada, em que a disponibilidade de oxigênio era de 21% (MENG *et al*., 2012). De maneira oposta, tem-se também o desenvolvimento de compostos terapêuticos que são capazes de inibir a atividade da HIF-1 através da regulação da expressão de mRNA (do inglês, *messenger* RNA) de HIF-1 (p. ex., Aminoflavone e EZN-2698), da tradução do HIF-1 (p. ex., Digoxina e Proscilaridina), da transcrição do HIF-1 (p. ex., Bortezomibe e Equinomicina) ou através do comprometimento da estabilidade da proteína HIF-1 (Apigenina e Geldanamicina) (ROHWER & CRAMER, 2011; HAYCOCK, 2011; MASOUD & LI, 2015).

Além do desenvolvimento de um ambiente hipóxico, os tumores sólidos e os esferoides tumorais apresentam outras características, já discutidas anteriormente, que podem influenciar na resposta das células aos fármacos utilizados, como, por exemplo, a superexpressão de E-caderinas. Xu, Farach-Carson E Jia (2014) mostraram que a ação da cisplatina foi menos eficaz em esferoides que

apresentaram maiores expressões de E-caderinas. A associação entre as E-caderinas e a resistência a fármacos foi elucidada em estudos em que, após o uso de agentes (anticorpo monoclonal SHE78-7) que bloqueavam a ação das E-caderinas em esferoides de câncer colorretal HT-29, verificou-se aumento no acúmulo intracelular de quimioterápicos como Paclitaxel e Vinblastina (GREEN *et al*., 2004). Estudos têm sido realizados para entender quais mecanismos governam esse fenômeno, e alguns relacionam o bloqueio da função das E-caderinas a uma diminuição da expressão de MDR-1 (LIANG *et al*., 2016).

A organização das células tumorais em uma estrutura 3D por si só já influencia a sensibilidade dessas células aos fármacos antineoplásicos. Como discutido anteriormente, o posicionamento e a interação das células somados à deposição de proteínas da MEC promovem uma barreira física nesses tumores sólidos e esferoides tumorais que limita a penetração dos fármacos. Esferoides de câncer de pâncreas PANC-1 demonstraram-se resistentes ao tratamento com Gemcitabina, e essa resistência foi associada à elevada produção de proteínas de matriz, como colágeno tipo 1, fibronectina e lumican, que limitavam a penetração do fármaco (LONGATI *et al*., 2013). Por sua vez, a capacidade de penetração desses compostos mostra-se dependente também do tamanho desses esferoides (GONG *et al*., 2015). A deposição das proteínas da MEC sobre o esferoide causa também um aumento na densidade destes e consequente aumento da pressão do fluido intersticial, prejudicando a penetração de alguns fármacos (MINCHINTON & TANNOCK, 2006). A redução da densidade da MEC com proteases, como colagenase, hialuronidase, tripsina e relaxina, mostra-se uma estratégia interessante para aumentar a penetração de fármacos nos esferoides, tendo potencial para um possível uso terapêutico (CHOI *et al*., 2013). Essa estratégia funcionou para aumentar a penetração da DOX em esferoides de tumor de laringe e de pulmão (KOHNO; OHNUMA; TRUOG, 1994) e tem funcionado para melhorar a penetração e distribuição de nanopartículas (EIKENES *et al*., 2010; ZHOU *et al*., 2016).

A resistência está associada também ao microambiente tumoral onde o tumor está inserido e às interações das células com a MEC. O aumento na deposição de proteínas da MEC nos esferoides, como colágeno e fibronectina, pode também gerar um microambiente quimiorresistente, como observado nos esferoides de sarcoma e osteossarcoma tratados com DOX, Gemcitabina e Docetaxel (BAI *et al*., 2015). Alguns quimioterápicos que se ligam a integrinas e reduzem essa interação célula-

MEC, como Etaracizumab, Intetumumab e Volociximab, foram testados em esferoides, sendo capazes de reduzir algumas propriedades do tumor, como a capacidade de proliferação e invasão (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016). Além disso, a sensibilidade dos esferoides de câncer de cabeça e pescoço à radioterapia também aumentou quando houve inibição das integrinas e, por consequência, das cascatas de sinalização que são essenciais para os processos de proliferação e sobrevivência celular (EKE & CORDES, 2011).

A captação dos compostos pelas células tumorais também pode ser influenciada pelo baixo pH presente nos esferoides (WOJTKOWIAK *et al*., 2011; MEHTA *et al*., 2012). Compostos com carga possuem maior dificuldade de atravessar a membrana celular, logo, fármacos básicos fracos, como DOX, Mitoxantrona, Vinblastina, Antraquinonas e alcaloides da Vinca, acabam sendo protonados em ambiente ácido e são menos eficientes na transposição da membrana (WOJTKOWIAK *et al*., 2011; SAGGAR *et al*., 2013). Como contrapartida terapêutica, têm-se utilizado inibidores dos transportadores de lactato, regulando o acúmulo de lactato no interior dos tumores, levando ao aumento do pH (BALTAZAR *et al*., 2014; JONES *et al*., 2017). Alguns estudos investigaram a alteração da expressão de MDR-1/P-gp, que leva à resistência, com aumento da expressão de GLUT-1 e acúmulo de lactato, resultados das mudança metabólica que as células tumorais sofrem (BERGMAN *et al*., 2003). Em esferoides de glioma e câncer de próstata, a expressão de P-gp foi capaz de reduzir a atividade de GLUT-1 (WARTENBERG *et al*., 2003).

Por fim, a presença das CTTs nos tumores sólidos também vem sendo associada à resistência destes a alguns fármacos. As CTTs demonstram-se resistentes à quebra de DNA induzida por radiação (SOTIROPOULOU *et al*., 2010; BECK & BLANPAIN, 2013), além de ter sido observado um enriquecimento dessa subpopulação de células após a radioterapia (BAO *et al*., 2006; DIEHN *et al*., 2009). Os mecanismos moleculares por trás da resistência das CTTs aos quimioterápicos necessitam ainda ser melhor estudados (WANG; ZHANG; CHEN, 2019). A hipótese é que as CTTs sobrevivem após tratamento com alguns fármacos por meio de mecanismos como ativação da TEM; indução de vias de sinalização que regulam a autorrenovação ou influenciam o microambiente tumoral; aumento da expressão de transportadores de compostos (P-gp, por exemplo), MDR-1 ou proteínas antiapoptóticas; recrutamento das CTTs quiescentes após morte das células

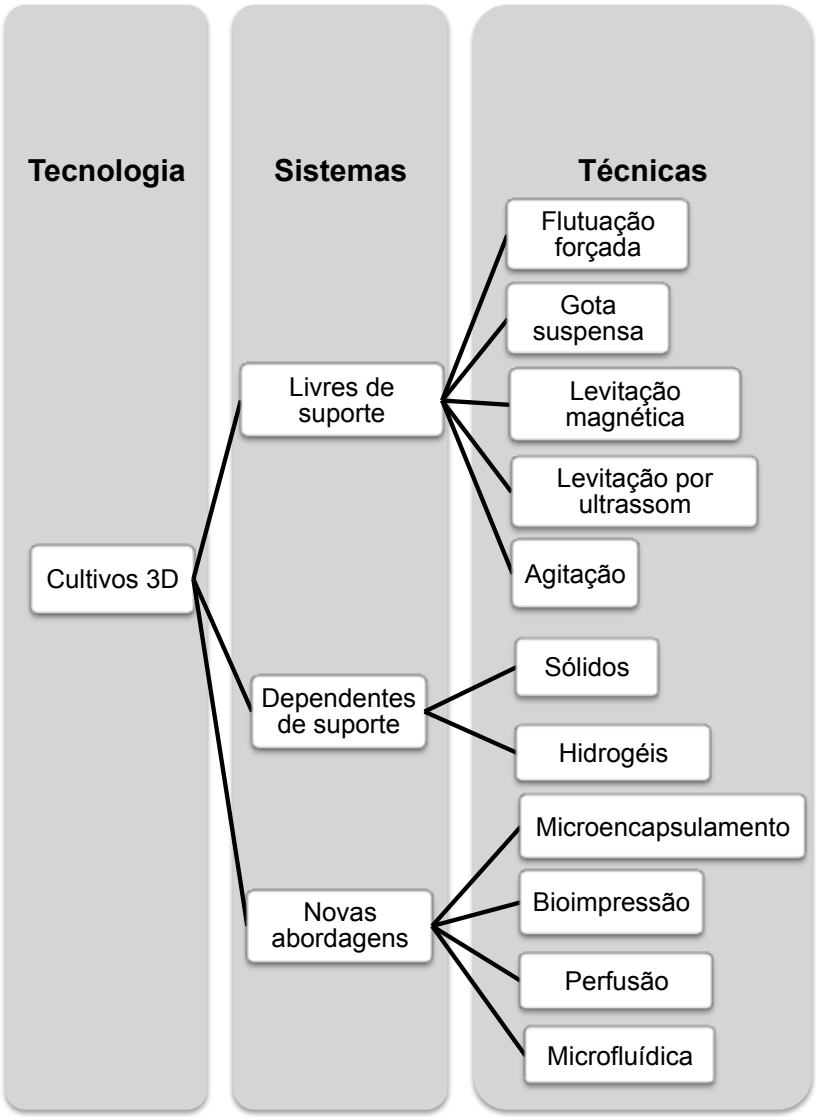
tumorais da superfície mais externa do tumor; e mecanismos epigenéticos de modificações de histonas e metilação de DNA (PHI *et al*., 2018). Os fármacos que possuem como alvo as células CTT vêm sendo estudados por muitos grupos de pesquisa. Alguns desses fármacos já foram testados em esferoides de câncer de pâncreas (Rapamicina) (MATSUBARA *et al*., 2013) e em esferoides de câncer de ovário (anticorpo A3D8 anti-CD44) (GU *et al*., 2012). Outros fármacos focados nas vias de sinalização, proliferação e diferenciação das CTTs encontram-se em fase de estudos clínicos (FRANCO *et al*., 2016; ROSA *et al*., 2016; PÜTZER; SOLANKI; HERCHENRÖDER., 2017).

Frente ao acima exposto, os cultivos de células tumorais em condições 3D que possam reproduzir as características citadas trazem um grande ganho na longa batalha contra o câncer. A maioria das técnicas conhecidas atualmente para o estabelecimento desses modelos não atende a todos os critérios mencionados, no entanto, cada técnica tem seus pontos fortes e limitações. Um modelo ideal de cultura 3D de tumores deve ser capaz de simular a fisiologia específica do tecido ou o microambiente fisiopatológico específico da doença para que as células possam se proliferar, agregar e diferenciar (LANGHANS, 2018).

1.3 SISTEMAS DE CULTIVOS 3D

Os sistemas de cultivos celulares 3D podem ser divididos em (COSTA *et al*., 2016; KOLEDOVA, 2017): (1) livres de suporte, em que as células encontram-se suspensas no meio de cultura, ou seja, não estão aderidas ou dispersas em nenhum tipo de material; (2) dependentes de suporte, em que as células crescem ou aderidas a suportes sólidos ou embebidas em suportes semissólidos de aspecto gelatinoso. Em cada sistema existem diferentes técnicas ou materiais para o estabelecimento dessas culturas. Novas abordagens que integram mais de uma técnica desses diferentes sistemas, como microencapsulamento de esferoides, bioimpressão, cultivo em perfusão e dispositivos microfluídicos, também emergem como promissoras no aprimoramento das condições de cultivo desses sistemas 3D, buscando uma aproximação ainda maior das condições *in vivo* (Figura 2).

Figura 2. Esquema dos diferentes sistemas e técnicas aplicadas às tecnologias de cultivo 3D

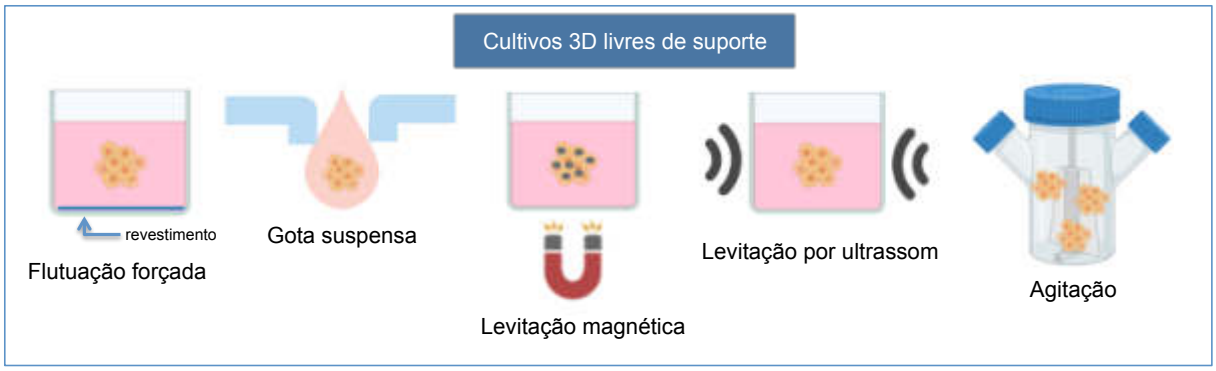


Representação esquemática das diferentes técnicas aplicadas às tecnologias de cultivo 3D organizadas de acordo com os tipos de sistemas de cultivo: livres de suporte, dependentes de suporte e novas abordagens.
Fonte: autoria própria.

1.3.1 Sistemas livres de suportes

Os sistemas de cultivo 3D livres de suporte não necessitam de qualquer tipo de material para o crescimento das células e a formação dos esferoides (BENIEN & SWAMI, 2014; JAGANATHAN *et al*., 2014). As principais técnicas aplicadas à esses sistemas são: flutuação forçada, gota suspensa, levitação magnética, ultrassom e agitação (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013) (Figura 3).

Figura 3. Diferentes técnicas aplicadas nos cultivos 3D livres de suporte



Representação esquemática das diferentes técnicas aplicadas nos cultivos 3D livres de suporte: flutuação forçada, gota suspensa, levitação magnética, levitação por ultrassom e agitação.
Fonte: autoria própria.

Sob condições específicas, as células tumorais são induzidas a se agregar de forma espontânea formando os esferoides (IVASCU & KUBBIES, 2006; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Esses sistemas dependem de uma capacidade de adesão célula-célula muito forte, o que pode variar entre as linhagens celulares. Proteínas da MEC são secretadas pelas próprias células (RICCI; MORONI; DANTI, 2013; YEON *et al.*, 2013; KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015), sendo possível, portanto, o estabelecimento de um certo grau de interação célula-MEC (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013). As principais vantagens desses sistemas residem no fato de os esferoides poderem ser gerados sem a necessidade de equipamentos, ferramentas ou materiais específicos, e a maioria das técnicas são de baixo custo, reprodutíveis e compatíveis com ensaios HTS (BENIEN & SWAMI, 2014; FANG & EGLEN, 2017; MCKEE & CHAUDHRY, 2017). Cada uma dessas técnicas possui vantagens e desafios (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais vantagens e desvantagens das técnicas de cultivo 3D livres de suporte para geração de esferoides tumorais

Técnicas	Vantagens	Desafios	Produtos comerciais/ Materiais/ Equipamentos
Flutuação forçada[1]	• Recapitula interações células-células; • Esferoides de tamanho e forma reprodutíveis; • Baixo custo; • Não necessita de equipamentos e materiais especiais; • Fácil manuseio; • Alta aplicabilidade em plataformas HTS.	• Não mimetiza resistência física da MEC; • Nem todos os tipos celulares se agregam com facilidade.	• Corning® Costar® Ultra-Low Attachment multiwell plates; • PrimeSurface® 3D Culture Spheroid plates (S-Bio); • GravityTRAP™ Ultra-Low Attachment (InSphero).
Gota suspensa[2]	• Recapitula interações células-células; • Melhor recapitulação da interface célula/líquido/ar; • Esferoides de tamanho e forma reprodutíveis; • Baixo custo.	• Não mimetiza resistência física da MEC; • Volume máximo de meio por gota muito baixo: maior risco de evaporação; • Sensível a perturbações mecânicas (causam danificação nos esferoides e queda na gota); • Requer técnica para plaqueamento e manuseio das placas; • Necessidade de transferência dos esferoides para outros sistemas para realizar ensaios *endpoint*.	• GravityPLUS™ Hanging Drop System (InSphero); • Perfecta 3D 96 wells Hanging Drop Plates (3DBiomatrix).
Levitação magnética[3]	• Recapitula interações células-células; • Pode proporcionar agregação de qualquer tipo celular.	• Não mimetiza resistência física da MEC; • Alto custo dos equipamentos utilizados; • Possível influência das nanopartículas magnéticas no comportamento da célula e resposta aos fármacos.	• Greiner Bio-One's Magnetic 3D Cell Culture.
Levitação por ultrassom[4]	• Recapitula interações células-células; • Promove agregação das células enquanto levitam sem a necessidade de partículas; • Não há interferências mecânicas que danifiquem os esferoides.	• Não mimetiza resistência física da ME; • Alto custo e complexidade dos equipamentos utilizados; • Alto risco de contaminação devido à dificuldade de esterilização dos equipamentos; • Limitado à geração de esferoides de tamanho pequeno.	• Microplacas convencionais; • Transdutores ultrassônicos em forma de anel; • Sonicadores.
Agitação[5]	• Possibilita produção de esferoides em larga escala; • Recapitula interações células-células; • Melhor transporte de oxigênio e nutrientes; • Diluição dos metabólitos; • Pode prolongar tempo de cultivo (biorreatores).	• Requer equipamentos especiais; • Não mimetiza resistência física da MEC; • Cisalhamento pode danificar os esferoides; • Baixa reprodutibilidade; • Distribuição heterogênea dos esferoides formados; • Requer altas concentrações de células iniciais; • Baixa compatibilidade com HCS e HTS (não miniaturizado); • Necessidade de transferência dos esferoides para outros sistemas para realizar ensaios *endpoint.*	• Frasco *Erlenmeyer;* • Frasco *spinner;* • Biorreator de tanque agitado; • Biorreator de parede rotatória RWV (Synthecon); • Biorreator de vórtice de Taylor.

[1] Ivascu e Kubbies, 2006; Li *et al*., 2011; Stuart *et al*., 2017.
[2] Kelm *et al*., 2003; Foty, 2011; Chitnis E Weiner, 2017; Shri *et al*., 2017; Langhans, 2018.
[3] Souza *et al*., 2010; Haisler *et al*., 2013; Tseng *et al*., 2013; Lewis *et al*., 2016.
[4] Fadero e Shah, 2014; Olofsson *et al*., 2018; Nakao *et al*., 2019.
[5] Foty e Steinberg, 2005; Ginai *et al*., 2013; Santo *et al*., 2016; Cui; Hartanto; Zhang, 2017; Rebelo *et al*., 2017.

1.3.1.1 Técnica de cultivo: flutuação forçada

A técnica de flutuação forçada consiste no cultivo das células em superfícies hidrofílicas ou hidrofóbicas que suprimem as interações entre as células e o substrato de cultivo. Essas superfícies podem ser geradas por meio do revestimento com algum polímero sintético como poli(2-Hidroxietilmetacrilato) ou poli-HEMA (IVASCU & KUBBIES, 2006), ou natural como agarose (LI *et al*., 2011). Alternativamente, microplacas pré-revestidas, denominadas de microplacas de ultrabaixa adesão (ULA, do inglês, *ultra-low attachment*), encontram-se disponíveis comercialmente com diferentes quantidades de poços. A mais utilizada é a de 96 poços, que está disponível nos modelos de fundo plano ou arredondado (côncavo). Outro método também utilizado é o da fabricação de micromoldes com materiais não adesivos. Nessa abordagem, fabricam-se estruturas repletas de micropinos com dimensões geométricas bem definidas, que serão utilizadas como moldes para formar micropoços em um hidrogel não adesivo biocompatível. Após solidificação e plaqueamento das células, tem-se a produção de esferoides em grande quantidade (podem chegar a 800 esferoides/molde) com tamanho controlado (RAGO *et al*., 2008; ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2012).

1.3.1.2 Técnica de cultivo: gota suspensa

Na técnica de gota suspensa, como o próprio nome diz, os esferoides se formam em pequenas gotas de meio de cultura que ficam penduradas ou em lamínulas de vidro, que são mantidas invertidas em uma bandeja, ou em microplacas especiais que possuem poços abertos sem fundo (FOTY, 2011). Por gravidade, as células se acumulam na interface líquido-ar para formar um único esferoide. As trocas gasosas nos esferoides produzidos por essa técnica são relativamente maiores (KELM *et al*., 2003). Como exemplo de aplicação da técnica, podemos citar a geração de esferoides de hepatócitos e células cardíacas para ensaios de toxicidade (CHITNIS & WEINER, 2017; SHRI *et al*., 2017). As principais desvantagens dessa técnica estão relacionadas ao baixo volume de meio de cultura utilizado para a formação da gota, à necessidade de transferir os esferoides para outras microplacas para realização dos ensaios e à alta suscetibilidade a danificações na cultura por choques mecânicos (LANGHANS, 2018).

1.3.1.3 Técnica de cultivo: levitação magnética

A técnica de levitação magnética é recente e consiste em pré-carregar as células com nanopartículas magnéticas e utilizar um campo magnético externo para que as células flutuem até a interface ar/meio da cultura, promovendo a agregação celular e a formação dos esferoides (SOUZA *et al*., 2010). A técnica tem sido utilizada com sucesso para a geração de esferoides de diferentes linhagens celulares (HAISLER *et al*., 2013; TSENG *et al*., 2013; LEWIS *et al*., 2016). No entanto, necessita ser melhor validada, uma vez que faltam dados que comprovem a não interferência das nanopartículas magnéticas no comportamento das células e nos ensaios de resposta aos fármacos.

1.3.1.4 Técnica de cultivo: levitação por ultrassom

Outra recente técnica envolve a utilização de radiação acústica através de uma onda estacionária ultrassônica que concentra as células e promove a agregação enquanto elas permanecem suspensas no meio de cultura (OLOFSSON *et al*., 2018). A técnica envolve basicamente o uso de um transdutor de ultrassom, como do tipo de conexão a parafuso Langevin, uma placa de cultura de células de poliestireno e um equipamento para fixação dessa placa (NAKAO *et al*., 2019). Esses equipamentos são de alto custo e difíceis de ser esterilizados (LIU *et al*., 2007), o que eleva o risco de contaminação das culturas. Outra desvantagem é o tamanho limitado dos esferoides produzidos. Embora o ultrassom de alta frequência possa produzir uma força que agregue as células de maneira eficiente, os esferoides formados são pequenos devido ao comprimento de onda da onda estacionária de alta frequência ser curto (FADERO & SHAH, 2014). Estudos estão sendo desenvolvidos para aprimorar a técnica, permitindo a produção de esferoides de tamanhos maiores (OLOFSSON *et al*., 2018).

1.3.1.5 Técnica de cultivo: agitação

O cultivo sob agitação é uma técnica vastamente empregada para geração de esferoides. A agitação contínua evita a adesão das células à superfície dos frascos e

reservatórios e promove a colisão entre as células, favorecendo a formação dos esferoides (FOTY & STEINBERG, 2005). A velocidade de agitação a ser utilizada é o ponto crítico desta abordagem, pois uma baixa agitação pode não ser suficiente para manter as células em suspensão e promover sua colisão e posterior agregação. Por outro lado, altas velocidades induzem o cisalhamento celular (REBELO *et al*., 2017). O movimento do fluido auxilia no transporte de massa dos nutrientes e na diluição de metabólitos produzidos pelas células presentes nos esferoides (JONG, 2005). Vários trabalhos usam sistemas de cultivo em suspensão para geração de esferoides (GINAI *et al*., 2013; SANTO *et al*., 2016). Para isso, lança-se mão de técnicas de agitação mecânica e magnética utilizando frascos Erlenmeyer e frascos com impelidores e barras magnéticas do tipo *spinner*, respectivamente. Há relatos na literatura envolvendo a geração de esferoides originados de célula-tronco em frascos *spinner* (HUNT *et al*., 2014; ARORA *et al*., 2019).

Técnicas agitadas mais sofisticadas utilizam biorreatores como os de tanque agitado. Nesses equipamentos, há um estrito e preciso monitoramento e controle de parâmetros como pH, temperatura e oxigênio dissolvido (MARTIN & VERMETTE, 2005). Sensores dentro do biorreator conectados ao *software* de controle monitoram o influxo e o efluxo de nutrientes e metabólitos. Já nos cultivos em frascos Erlenmeyer e *spinner*, os parâmetros de pH, temperatura e oxigênio dissolvido não podem ser controlados de forma automatizada. Técnicas de cultivos estáticas podem causar rápida depleção de oxigênio e nutrientes, aumentando as concentrações de subprodutos metabólicos e osmolalidade (CHATZINIKOLAIDOU, 2016). O uso dos biorreatores pode prolongar o tempo de cultivo e fornecer condições fisiológicas (bioquímicas) e biomecânicas próximas às observadas *in vivo,* como, por exemplo, condições de penetração de nutrientes e gases (YAO *et al*., 2013; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2014).

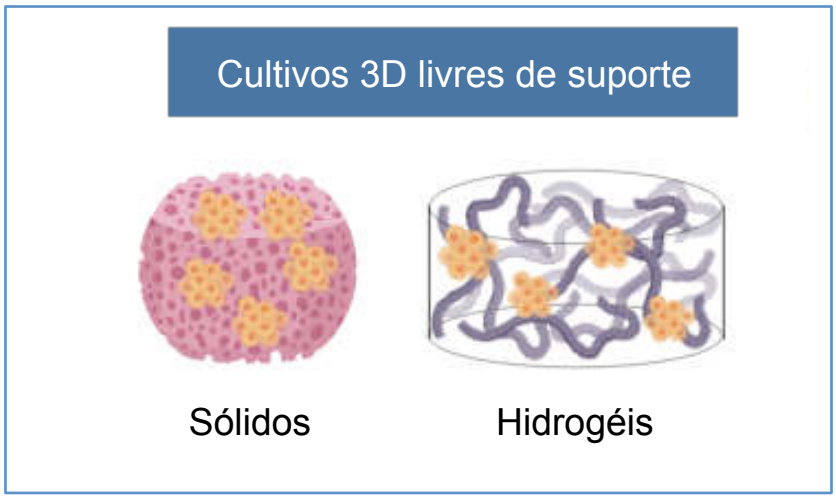
As desvantagens das técnicas agitadas convencionais para o cultivo 3D é que, na maioria das vezes, os esferoides produzidos possuem grande variação de tamanho e forma (HWANG *et al*., 2013), além de estarem sujeitos a forças de cisalhamento que podem modificar a estrutura e até a fisiologia desses esferoides (HUNT *et al*., 2014). O biorreator de parede rotatória RWV (do inglês, *rotating wall vessel bioreactor*) desenvolvido pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA, Washington, EUA) é o que mais se destaca na produção de esferoides, por

ter a capacidade de minimizar o cisalhamento graças à geração de um ambiente com microgravidade (CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017). Os biorreatores RWV são constituídos por dois cilindros coaxiais, e a movimentação do meio de cultura e das células se dá pela movimentação rotacional da parede do reservatório (cilindro externo) (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013). Esferoides de adenocarcinoma de colón humano foram gerados com sucesso utilizando esses biorreatores (CARVALHO *et al*., 2005; WARREN *et al*., 2008), que são considerados hoje os que apresentam melhor controle do ambiente hidrodinâmico (SAINI & WICK, 2003). Algumas limitações ainda dificultam a aplicação dessas técnicas para a geração de esferoides, como, por exemplo, o requerimento de altas concentrações iniciais de células (MEHTA *et al*., 2012).

1.3.2 Sistemas de cultivo 3D dependentes de suportes

Os esferoides também podem ser gerados utilizando suportes que servem como estruturas mecânicas para o crescimento e agregação das células. Idealmente, esses suportes devem possuir uma estrutura física próxima à encontrada na MEC nativa dos tecidos humanos. Esses suportes podem ser sólidos ou de aspecto gelatinoso, como os hidrogéis (Figura 4).

Figura 4. Diferentes técnicas aplicadas nos cultivos 3D dependentes de suporte.



Representação esquemática das diferentes técnicas aplicadas nos cultivos 3D dependentes de suportes sólidos ou hidrogéis.
Fonte: autoria própria.

Algumas propriedades desses materiais utilizados para suporte são importantes para o sucesso do cultivo, como a presença de regiões de adesão celular, hidrofobicidade, porosidade, área superficial disponível e rigidez (CARLETTI; MOTTA; MIGLIARESI, 2011; KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015; LANGHANS, 2018). Essas propriedades, similares à MEC, influenciarão na migração e proliferação das células, na permeabilidade dos nutrientes e oxigênio e no acúmulo de metabólitos, assim como observado *in vivo* (BAKER & CHEN, 2012). Os suportes podem ser produzidos com diversos materiais, como cerâmicas, vidro, metais e polímeros, sendo estes últimos os mais utilizados devido à facilidade em controlar algumas propriedades químicas e estruturais (HAYCOCK, 2011). Os biopolímeros, polímeros bioativos ou com aplicações médicas, são os que apresentam maior capacidade de reproduzir características da MEC, sendo, portanto, os mais utilizados. Os biopolímeros podem ser sintéticos, naturais ou semissintéticos. Os polímeros sintéticos mais utilizados para a fabricação desses suportes são o poli(ácido lático-glicólico) ou PLGA, o poli(etileno glicol) ou PEG, o ácido poliláctico ou PLA, o poli(álcool vinílico) ou PVA e o poliuretano ou PU (ASGHAR *et al*., 2015). Quanto aos naturais, originários de compostos provenientes dos seres vivos, os mais utilizados são alginato, gelatina, colágeno, amido, poli (hidroxibutirato), quitosana e as glicosaminoglicanas. Estes últimos podem apresentar semelhanças químicas e biológicas com os tecidos naturais (KIM *et al*., 2008). Como principais métodos para a produção desses suportes, podemos citar a impressão 3D, eletrofiação, formação de espuma, liofilização, lixiviação, litografia, moldagem particulada, sintetização a *laser*, polimerização química, polimerização por temperatura e evaporação de solventes (SULTANA & HASSAN, 2015).

A seleção do suporte para o cultivo 3D vai depender tanto das propriedades físicas do material, como porosidade, rigidez e estabilidade, quanto das biológicas, como compatibilidade e capacidade de adesão das células (CALIARI & BURDICK, 2016). A aplicação das culturas 3D dependentes de suporte em ensaios de seleção de fármacos é questionada quanto a possíveis interações entre os materiais e os fármacos, podendo afetar a absorção e adesão (ASGHAR *et al*., 2015), e quanto às dificuldades na recuperação das células nesses suportes para que possam ser utilizadas em ensaios adicionais (GUPTA *et al*., 2016). As vantagens e desafios das técnicas de cultivo 3D dependentes de suporte estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3 – Principais vantagens e desvantagens das técnicas de cultivo 3D dependentes de suportes, sólidos ou hidrogéis, para geração de esferoides tumorais

Técnicas	Vantagens	Desafios	Produtos comerciais/ Materiais/ Equipamentos
Sólidos (microcarregadores)[1]	• Aplicável para células que não se agregam espontaneamente; • Fornece suporte físico e estrutural; • Mimetiza propriedades biomecânicas da ECM; • Maior interação célula-matriz; • Proliferação de grande quantidade de células em pequenos volumes; • Reprodução dos compartimentos estromais; • Alta estabilidade em meio de cultura; • Possibilidade de ser cultivado em sistemas agitados.	• Possíveis interações entre os materiais e os fármacos; • Células podem não ter afinidade de adesão ao material; • Pode requerer equipamentos e métodos específicos para produção dos materiais; • Difícil recuperação das células.	• Cerâmicas; • Vidro; • Metais; • Polímeros sintéticos: PLGA, PEG, PLA, Poliuretano; • Polímeros naturais: alginato, colágeno, amido, poli(hidroxibutirato) (PHB), quitosana e os glicosaminoglicanos; • Cytodex™ 1 e 3 (GE Healthcare); • Cytopore™ (GE Healthcare); • PronectinF® (SoloHill); • HyQSphere™(Hyclone/SoloHill); • Hillex (SoloHill); • Cultispher-S e G® (Sigma-Aldrich); • GEM™ (Hamilton).
Hidrogéis naturais[2]	• Pode conter fatores de crescimento e outros compostos da MEC; • Fornece suporte físico e estrutural; • Suporte mais maleável; • Biocompatível; • Fornece interface célula-líquido; • Maior interação células-células e células-MEC; • Facilita a agregação celular; • Possibilita estudos de migração e invasão; • Mimetiza as características de suporte físico da ECM; • Recapitula propriedades bioquímicas da ECM; • Pode ter custo alto.	• Não é quimicamente definido; • Contém compostos de origem animal e vegetal; • Possibilidade de interações entre os materiais e os fármacos; • Alto risco de degradação por proteases; • Baixa reprodutibilidade: diferenças de lote para lote; • Difícil recuperação das células; • Baixa compatibilidade com HCS e HTS; • Distribuição heterogênea dos esferoides formados.	• Colágeno; • Fibrina; • Gelatina; • Alginato, • Quitosana; • Ácido hialurônico; • BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Bioscience) • Corning® Matrigel® Matrix (Corning)
Hidrogéis sintéticos[3]	• Fornece suporte físico e estrutural; • Suporte mais maleável e inerte; • Passível de funcionalização; • Propriedades mecânicas controláveis; • Custo inferior ao natural; • Alta reprodutibilidade; • Facilita a agregação celular; • Fornece interface célula-líquido; • Maior interação células-células e células-MEC; • Possibilita estudos de migração e invasão.	• Difícil recuperar algumas propriedades da MEC nativa; • Baixa estabilidade em meio de cultura; • Ausência de sítios de adesão em alguns casos; • Difícil recuperação das células; • Possibilidade de interações entre os materiais e os fármacos; • Baixa compatibilidade com HCS e HTS; • Distribuição heterogênea dos esferoides formados.	• PA; • PEG; • PGA; • Álcool polivinílico; • Poli-Hema; • Prolicaprolacton; • Metilcelulos; • Peptídeos: EAK16, RADA16, Fmoc-FF, Fmoc-RGD, h9e, FEFK, FEFKEFK e MAX1; • HydroMatrix™ (Sigma-Aldrich); • PuraMatrix™ (Corning).

[1] Maurer *et al*., 1999; Knight *et al*., 2011; Ricci*;* Moroni; Danti, 2013; Benien e Swami, 2014; Dávila & D'Ávila, 2018; Li *et al*., 2014; Brancato *et al*., 2017.
[2] Wong, 2011; Gill e West, 2014; Orgel; Persikov; Antipova, 2014; Sathaye *et al*., 2015; Burdick, 2016; Rodenhizer *et al*., 2016; Finnberg *et al*., 2017; Silva *et al*., 2017.
[3] Jonker; Löwik; van Hest, 2012; Serra *et al*., 2013; Worthington; Pochan; Langhans, 2015; Jakubikova *et al*., 2016; Rabionet *et al*., 2017; Zhang e Khademhosseini, 2017.

1.3.2.1 Técnica de cultivo: suportes sólidos

Os sistemas de cultivo 3D baseados em suportes sólidos utilizam polímeros pré-fabricados que funcionam como suportes físicos aos quais as células irão aderir, migrar e preencher compartimentos, adquirindo uma configuração geométrica 3D (KNIGHT *et al*., 2011). Podem ser projetados para ser uma matriz inerte ou mimetizar a MEC, recriando o microambiente nativo de tecidos. A mimetização de um tecido é um processo complexo e envolve um sistema de interações altamente organizado, não somente entre as células que o constituem, mas também dessas células com outros tipos celulares e a matriz extracelular, incluindo a membrana basal à qual está ligado (ALCARAZ; NELSON; BISSELL, 2004). Uma vez que a matriz celular pode afetar a organização e função da célula, técnicas de cultura 3D que incorporam estruturas semelhantes a essas matrizes auxiliam na mimetização de um cenário *in vivo*, uma vez que permitem interações célula-matriz.

É mais ampla e conhecida a aplicação desses suportes sólidos em estudos de regeneração tecidual, uma vez que buscam recriar o ambiente físico natural e estrutural de ossos, ligamentos e cartilagem para cultivo de células vasculares, musculares esqueléticas, da pele e do sistema nervoso central (LANGHANS, 2018). A aplicação dessa técnica para cultivo de células tumorais para o desenvolvimento de fármacos iniciou-se mais recentemente com os trabalhos de Girard *et al*. (2013), que utilizaram um suporte fibroso para este fim. Essa abordagem mostra-se bastante interessante, por exemplo, para estudos de tumores ósseos. Com estruturas feitas à base de quitosana-alginato, Kievit *et al*. (2016) descreveram a influência dos compartimentos estromais na agressividade do tumor. Mais recentemente, Angeloni *et al*. (2017) exploraram a importância de células-tronco derivadas de tecidos adiposos na promoção da adesão de células de câncer de mama em suportes feitos com polímero poliuretano.

A dinâmica de crescimento das células nesses modelos depende, dentre outros fatores, das características do material que compõe o suporte. A porosidade, dada pela interconectividade dos poros, a resistência mecânica, a composição química, a biodegradabilidade e a biocompatibilidade do biomaterial (DÁVILA & D'ÁVILA, 2018) influenciarão diretamente nos comportamentos celulares como proliferação, migração, adesão e diferenciação (GRAVEL *et al*., 2006; BADROSSAMAY *et al*., 2014; WU *et al*., 2014). A principal desvantagem dessa técnica refere-se ao

requerimento de equipamentos e métodos específicos para produção dos materiais, e a reprodutibilidade do método é altamente dependente das técnicas utilizadas na produção do suporte (RICCI; MORONI; DANTI, 2013). Um suporte sólido bastante utilizado para adesão de células são os microcarregadores.

Os microcarregadores são pequenas esferas, da ordem de 50 a 400 μm, com elevada área superficial (até 500 cm^2/g), utilizadas para a proliferação de grande quantidade de células em pequenos volumes, preservando a sua morfologia após o cultivo *in vitro* (JUSTICE *et al*., 2009). Os mais comuns são fabricados com gelatinas. Os tipos de microcarregadores com alta porosidade possuem maior superfície exposta a adesão e crescimento das células. A principal aplicação dos microcarregadores é na indústria, principalmente para o cultivo de células aderentes para produção de proteínas recombinantes e vacinas virais, bem como para cultivo de células estromais mesenquimais (MIZUKAMI *et al*., 2018). A principal vantagem de utilizar microcarregadores é poder agregar em estruturas 3D as células que não se agregariam espontaneamente (BENIEN & SWAMI, 2014). Os microcarregadores podem ser fabricados com polímeros sintéticos e naturais e estão disponíveis comercialmente, por exemplo, Cytodex™ (GE Healthcare, Chicago, EUA), Cytopore™ (GE Healthcare), PronectinF® (SoloHill Engineering Inc, Ann Arbor, EUA), HyQSphere™ (Hyclone™, GE Healthcare/SoloHill), Hillex (SoloHill), Cultispher-S e G® (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA), GEM™ (Hamilton, Reno, EUA), entre outros.

O diâmetro, densidade, propriedades da superfície e composição química podem afetar a adesão e proliferação celular (SUN *et al*., 2011). Maurer *et al*. (1999) foram os primeiros a explorar os microcarregadores no cultivo de células tumorais para uso em ensaios de eficácia de fármacos. Utilizando microcarregadores Cultispher, eles cultivaram células de carcinoma de pulmão (A549) e mostraram que houve um aumento na resistência dessas células aos fármacos testados em comparação com o cultivo celular em monocamada. Outros trabalhos mostraram resultados promissores com o cultivo de células de hepatocarcinomas, em microcarregadores de alginato-quitosana liofilizados (LI *et al*., 2014) e células de câncer de pâncreas, em microcarregadores porosos de gelatina (BRANCATO *et al*., 2017). A recapitulação do microambiente tumoral *in vivo* por essa técnica vai desde o rearranjo morfológico das células, interações célula-célula nos microcarregadores, até um aumento na expressão de proteínas da MEC (BRANCATO *et al*., 2017). Os

microcarregadores podem ser utilizados em sistemas de cultivo em suspensão como os frascos Erlenmeyer e *spinner* e até mesmo em biorreatores. Devido ao tamanho micrométrico, eles também podem ser incorporados em dispositivos microfluídicos (GIOIELLA *et al*., 2016).

1.3.2.2 Técnica de cultivo: embebidos em hidrogéis

Diferentemente dos suportes sólidos, os hidrogéis são compostos com aspecto de géis com características mais maleáveis. Os hidrogéis são formados por redes reticuladas de polímeros e copolímeros hidrofílicos, que possuem estrutura e propriedades definidas e formam um gel com alta quantidade de água, fornecendo interface célula-líquido (SATHAYE *et al*., 2015). Após a polimerização do gel, as células ficam encapsuladas ou embebidas nessa rede tridimensional. Essas redes são formadas por reticulação intermolecular (rede polimérica) ou por reticulação interfibrilar (rede supramolecular de hidrogel fibrilar) (WORTHINGTON; POCHAN; LANGHANS, 2015). Os hidrogéis podem facilitar as vias de sinalização e permitir maior interação célula-célula e célula-matriz (LÜ *et al*., 2014). Trabalhos mostram que os hidrogéis podem promover proliferação celular (HOTARY *et al*., 2003), angiogênese (JIANG & HARDING, 1998) e até cicatrização de feridas. Algumas atividades celulares podem ser reguladas com modificações das propriedades físicas do hidrogel, como mostrado por Spil *et al*. (2016).

Os hidrogéis podem ser de origem natural, como no caso do colágeno, fibrina, gelatina, alginato, quitosana, ácido hialurônico e (HA), BD Matrigel™ *Basement Membrane Matrix* (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) e Corning® Matrigel® *Matrix* Matrigel (Corning Inc, Nova York, EUA); são caracterizados como biocompatíveis, apresentando propriedades naturais de adesão, e são capazes de promover funções fisiológicas celulares. Normalmente, as culturas em hidrogéis naturais apresentam alta viabilidade celular e proliferação, diferenciação controlada e fenótipo celular semelhante ao observado *in vivo* (ORGEL; PERSIKOV; ANTIPOVA, 2014).

Hidrogéis de colágeno tipo 1 são bastante populares, uma vez que esse composto é bastante abundante na MEC do microambiente tumoral (RODENHIZER *et al*., 2016). O colágeno facilita a adesão das células por meio dos receptores de integrinas, que vão ativar a via de sinalização celular associada à sobrevivência, crescimento e diferenciação celular (KUTSCHKA *et al*., 2006). A ativação dessa

cascata pode modular a resposta das células à quimioterapia, imunoterapia e radiação (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016; DICKREUTER & CORDES, 2017). Outro polímero, a fibrina, é obtido após a polimerização do fibrogênio, uma proteína plasmática, que é formada naturalmente durante o processo de coagulação sanguínea. Apesar do uso em culturas 3D, possui a limitação de não ser adequada em culturas de longo prazo devido à alta suscetibilidade a degradação por proteases (BROWN & BAKER, 2014; CALIARI & BURDICK, 2016). A gelatina, por sua vez, é uma mistura de poli e oligopeptídeos derivados da hidrólise parcial do colágeno. É um material estabilizado por modificações covalentes e pode ser parcialmente degradado por temperatura (ponto de fusão entre 25 e 35 graus Celsius) ou por reações químicas. Alterações nas ligações entre grupos funcionais podem gerar géis de gelatina especiais que podem ser fotorreativos ou controlados por oxigênio, permitindo a formação de culturas 3D com gradiente de hipóxia (BANKS; HARLEY;BAILEY, 2015; LEWIS *et al*., 2017). O HA, uma importante glicosaminoglicana presente no líquido sinovial, humor vítreo e tecido conjuntivo de vários organismos, tem sido bastante caracterizado, sendo aplicado em diversas áreas, incluindo cultivos 3D de tumores (BURDICK & PRESTWICH, 2011; BAEVA *et al*., 2014; GOUBKO *et al*., 2014).

O alginato de sódio é um polissacarídeo encontrado em algumas bactérias e na parede celular e intracelular de algas marrons (DRURY; DENNIS; MOONEY, 2014). A gelificação ocorre após a combinação com cátions bivalentes (p. ex., cloreto de cálcio), que geram ligações entre o ácido β-D-manurônico (bloco M) e α-L-gulurônico (bloco G). A proporção entre esses dois componentes, M e G, determina as propriedades físicas desse polissacarídeo e o tipo de hidrogel formado. Por exemplo, alginatos ricos em blocos G formam géis mais quebradiços, enquanto os ricos em blocos M formam géis mais elásticos (DRURY *et al*., 2014). O alginato tem ampla aplicação na indústria de alimentos, cosméticos e medicina (NAGASAWA *et al*., 2000). As propriedades mecânicas e a rápida degradação, devido ao caráter hidrofílico, limitam parcialmente o uso desse hidrogel nas culturas 3D. No entanto, há registros do uso desse material para suportes em cultura 3D de tecidos especializados, como o vascular, o ósseo e o cartilaginoso (AXPE & OYEN, 2016; JODDAR *et al*., 2016; SILVA *et al*., 2017).

Matigel é o nome comercial para uma mistura proteica gelatinosa secretada por células de sarcoma de rato Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), um tumor rico em

proteínas de matriz extracelular (WONG, 2011). A sua constituição é basicamente laminina e colágeno, com pequena fração de entactina, uma glicoproteína da membrana basal, e de alguns fatores de crescimento como o EGF, o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF, do inglês, *basic fibroblast growth factor*), o fator de crescimento de nervos (NGF, do inglês, *nerve growth factor*), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF, do inglês, *platelet-derived growth factor*), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1, do inglês, *insulin-like growth factor-1*) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF-β, do inglês, *transforming growth factor beta*) (HUGHES; POSTOVIT; LAJOIE, 2010). O Matrigel tem sido utilizado em culturas 3D com diferentes linhagens celulares, como células de câncer de mama (LEE *et al*., 2007), pâncreas (JIANG *et al*., 2014), próstata (COLLELA *et al*., 2004) e colorretal (FINNBERG *et al*., 2017).

Por serem de origem natural, tanto Matrigel quanto os outros hidrogéis naturais possuem outros componentes além dos constituintes principais, o que faz deles materiais não quimicamente definidos (GILL & WEST, 2014). Variações lote a lote podem interferir nas culturas e, por consequência, nos estudos farmacológicos. Para contornar tal questão, foi desenvolvida uma formulação de Matrigel com redução nos fatores de crescimento, permitindo culturas 3D com propriedades mais definidas (WALLACE & ROSENBLATT, 2003). Outra possível alternativa é o uso de hidrogéis sintéticos.

Os hidrogéis sintéticos são química e fisicamente bem definidos, além de possuírem propriedades mecânicas controláveis a fim de se alcançar a rigidez e porosidade desejada. Mesmo não sendo de origem natural, são capazes de imitar as propriedades biológicas da MEC. Podem ser funcionalizados com porções adesivas definidas, conter locais proteolíticos e encapsular fatores de crescimento, mimetizando a MEC (WORTHINGTON; POCHAN; LANGHANS, 2015; ZHANG & KHADEMHOSSEINI, 2017). As vantagens desses hidrogéis são o baixo custo, quando comparados aos naturais, são relativamente inertes e possuem propriedades reprodutíveis. Os hidrogéis sintéticos podem ser formados, principalmente, por PEG, poli-HEMA, PVA, poliacrilamida ou PAAm, poli(ácido γ-glutâmico) ou γ-PGA, policaprolactona ou PCL, metilcelulose e peptídeos (SERRA *et al*., 2013; RABIONET *et al*., 2017). Por ser uma área que vem atraindo grande interesse, novos hidrogéis sintéticos têm sido produzidos para serem aplicados em culturas 3D (FONTANA *et al*., 2019).

Os hidrogéis baseados em peptídeos causaram uma revolução na área de ciência dos materiais, sendo amplamente utilizados hoje nos cultivos 3D. Mesmo possuindo estrutura primária diversa, os peptídeos têm uma capacidade geral de formar estruturas nanofibrilares com enovelamento intermolecular e montagem intermolecular que são resultados de interferência física ou química. Além da alta versatilidade, as propriedades do material podem ser facilmente moduladas pela substituição de aminoácidos ou adição de epítopos funcionais (WORTHINGTON; POCHAN; LANGHANS, 2015). A substituição de um simples ácido em um peptídeo pode reduzir o tempo de gelificação do hidrogel, aumentando o seu campo de aplicação (WORTHINGTON *et al*., 2017).

Assim como revisado por Worthington, Pochan e Langhans (2015), os hidrogéis de peptídeos com maior sucesso na aplicação em culturas 3D são: peptídeos derivados de leveduras EAK16 e RADA16, Fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) com os peptídeos difenilalanina (FF) e arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), hidrogel de peptídeo h9e (baseado na fusão dos domínios funcionais da proteína da seda e canal de cálcio em humanos), FEFK e FEFKEFK (forma hidrogel na presença de metaloprotease) e o peptídeo MAX1, que gelifica em condições fisiológicas. Hidrogéis de peptídeos comerciais também estão disponíveis. Coculturas 3D de esferoides de mieloma e células mesenquimais foram realizadas com sucesso utilizando 0,5% do hidrogel de peptídeo comercial PuraMatrix (BD Biosciences) (JAKUBIKOVA *et al*., 2016). Outro exemplo de hidrogel de peptídeo comercial é o HydroMatrix™ (Sigma-Aldrich), que forma matrizes com poros nanométricos essenciais para assegurar um ambiente 3D para o crescimento das células. A composição do HydroMatrix não é especificada, mas não possui materiais de origem animal, o que traz alguns benefícios, como menores riscos de contaminantes animais e variações de lote (JONKER; LÖWIK; VAN HEST, 2012).

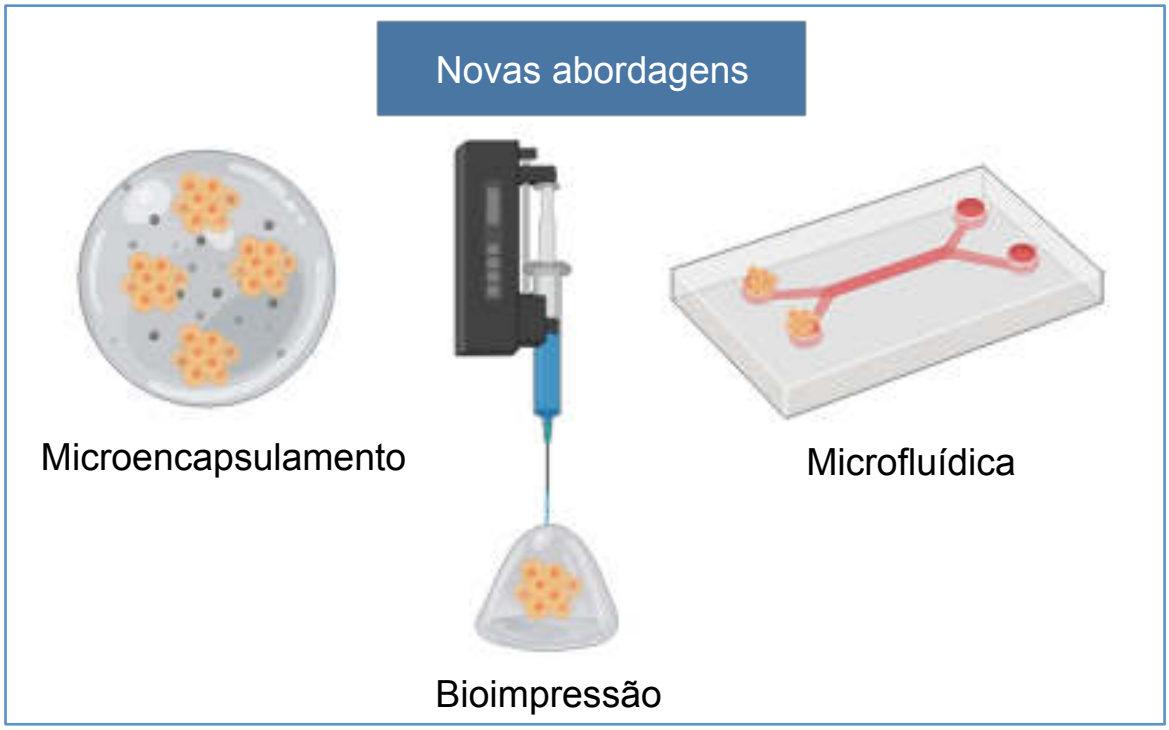
De origem natural ou sintética, os hidrogéis permitem que as células cresçam embebidas nas redes poliméricas e formem esferoides tumorais compactos. Pode ser interessante utilizar os hidrogéis para aumentar a viscosidade do meio de cultura em cultivos com tipos celulares que não se agregam com facilidade. Por exemplo, a metilcelulose tem sido utilizada para melhorar a agregação e compactação de células (MARITAN; LIAN; MULLIGAN., 2017), como a linhagem MCF-7 para formação de esferoides de câncer de mama (ZHANG *et al*., 2016). Da mesma maneira, a combinação de meio de cultura com pequenas concentrações de

hidrogéis naturais, como colágeno e Matrigel, pode auxiliar na formação dos esferoides.

1.3.3 Novas abordagens de cultivo 3D

Utilizando ou não suporte para a geração dos esferoides tumorais, estes podem ser cultivados utilizando diferentes abordagens, que buscam melhorar a mimetização do microambiente tumoral nativo (Figura 5). As vantagens e desvantagens das diferentes abordagens são apresentadas na Tabela 4.

Figura 5. Novas abordagens técnicas aplicadas nos cultivos 3D



Representação esquemática das novas abordagens técnicas aplicadas nos cultivos 3D: microencapsulamento, bioimpressão e microfluídica.
Fonte: autoria própria.

Tabela 4 – Principais vantagens e desvantagens de novas abordagens técnicas de cultivo 3D para geração de esferoides tumorais

Técnicas	Vantagens	Desafios	Produtos comerciais/ Materiais/ Equipamentos
Microencapsulamento[1]	• Posicionamento direcionado dos esferoides; • Maior controle da proporção células tumorais *vs.* células estromais (cocultura) por cápsula; • Proteção contra cisalhamento em sistemas agitados.	• Instabilidade do alginato (hidrogel mais utilizado); • Baixa interação do alginato com as células.	• Cápsula: alginato; • Pipeta para gotejamento; • Encapsulador automático.
Bioimpressão[2]	• Possibilita criar um padrão espacial de vários tipos celulares; • Construções complexas com microestruturas projetadas, com células uniformemente distribuídas.	• Método de impressão pode danificar as células; • Autoaquecimento pode matar as células.	• Biotinta: fibrinogênio, agarose, alginato, ácido hialurônico e gelatina; • Bioimpressoras de extrusão, jato de tinta, *laser* e estereolitografia.
Cultivo em perfusão[3]	• Permite constante perfusão de meio; • Possibilita que as células cresçam em condições dinâmicas com reduzido volume de meio; • Alta aplicabilidade em plataformas HCS.	• Baixa compatibilidade com HCS e HTS. •	• 3DKube (Kyatec); • LiveBox 1 e 2 (IVtech).
Microfluídica[4]	• Mimetiza um sistema vascularizado; • Possibilidade de miniaturização dos ensaios; • Fornece distribuição química entre os compartimentos; • Possibilita estudos de migração e invasão; • Permite análises em pouco tempo com alta precisão; • Pode prolongar tempo de cultivo.	• Baixa compatibilidade com HCS e HTS; • Requer avanços na miniaturização e automação do processo; • Faltam técnicas de monitoramento e análise.	• Fluigent; • Dolomite; • thinXXS Microtechnology; • MiniFab; • Elve Flow (Elvesys); • uFluidix; • TissUse Multi-Organ-Chip platform; • OrganoPlates (MIMETAS).

[1] Estrada *et al*., 2016; Nath e Devi, 2016; Santo *et al*., 2016; Reid; Permuth; Sellers, 2017.
[2] Tasoglu e Demirci, 2013; Dababneh e Ozbolat, 2014; Lee *et al*., 2015; Albritton & Miller, 2017; Dai *et al*., 2017.
[3] Cacopardo *et al*., 2019; Brancato *et al*., 2020.
[4] Sarioglu *et al*., 2015; Langhans, 2018.

1.3.3.1 Técnica de microencapsulamento de esferoides

Essa abordagem é baseada na combinação entre os dois principais sistemas de cultivo para geração de esferoides: com e sem suporte. Os esferoides são primeiramente gerados utilizando, em geral, uma das técnicas de cultivo sem suporte apresentadas anteriormente, e depois encapsulados em hidrogéis. Dessa maneira, os esferoides são imobilizados em posições determinadas na microcápsula de hidrogel (LASCHKE & MENGER, 2017a). Essas microcápsulas são mantidas em cultivo agitado, e o hidrogel protege as células dos efeitos de cisalhamento,

permitindo cultivos em longo prazo (DHAMECHA *et al*., 2019). Além disso, a técnica é bastante utilizada para cocultivo.

Diversos trabalhos cultivam, na forma de cápsulas, esferoides tumorais cocultivados com fibroblastos, recapitulando as interações das células tumorais com as células estromais presentes no microambiente tumoral (ESTRADA *et al*., 2016; SANTO *et al*., 2016). O hidrogel mais utilizado nessa abordagem é o alginato, devido a seu processo de gelificação simples. As cápsulas são formadas ao pingar gotas da suspensão de alginato contendo esferoides e fibroblastos em uma solução catiônica bivalente como a de cloreto de cálcio (KIM *et al*., 2019). As técnicas utilizadas vão desde gotejamento com pipetas e seringas até o uso de encapsuladores automáticos que permitem a formação de microcápsulas de tamanho e conteúdo controlados (NATH & DEVI, 2016). O tamanho das estruturas 3D geradas depende da viscosidade e velocidade de fluxo da solução de alginato, do tamanho dos esferoides encapsulados, do tipo de técnica empregada e da voltagem aplicada nos encapsuladores automáticos (ANDERSEN; AUK-EMBLEM; DORNISH, 2015). Além da necessidade de padronização das técnicas, as limitações dessa abordagem também estão relacionadas às propriedades do alginato. Além de possuir reduzida interação com as células, dependendo da concentração de alginato, as cápsulas podem ser facilmente rompidas durante a manipulação das culturas, o que limita a sua aplicação em alguns ensaios que exigem ciclos de troca de meio de cultura (REID; PERMUTH; SELLERS, 2017). Novos hidrogéis têm sido estudados para a geração das microcápsulas.

1.3.3.2 Técnica de bioimpressão de células tumorais

A bioimpressão, ou impressão celular, é um processo de manufatura aditiva em que uma mistura de materiais ou hidrogéis contendo células é depositada camada por camada, formando microestruturas 3D complexas (TASOGLU & DEMIRCI, 2013; (DABABNEH & OZBOLAT, 2014). Dessa maneira, é possível obter modelos com distribuição uniforme das células e uma organização espacial precisa, uma vez que essas serão impressas em locais específicos através dos métodos de extrusão, jato de tinta, *laser* e estereolitografia (BUCHANAN *et al*., 2014). A vantagem sobre as técnicas convencionais é criar um padrão espacial de vários tipos celulares ou componentes da MEC utilizando diferentes “biotintas” (mistura de um hidrogel com

células), sendo uma maneira de reconstruir *in vitro* um microambiente controlável (ALBRITTON & MILLER, 2017). Fibrinogênio, agarose, alginato, HA e gelatina são os principais materiais utilizados como “biotintas”.

Há vários relatos na literatura de cocultivos utilizando a técnica de bioimpressão, como exemplo, os modelos de células tumorais e do sistema imune (GROLMAN *et al*., 2015), de células-tronco de glioma e de células mesenquimais (DAI *et al*., 2017), e de células de tumores de ovário e fibroblastos (XU *et al*., 2011). A bioimpressão possibilita construir uma estrutura que mantém de maneira controlada a localização, densidade e distância de cada tipo celular utilizado na cocultura. A impressão de esferoides pré-formados também é possível, como demonstrado por Lee *et al*. (2015). Utilizando bioimpressão, esferoides tumorais foram posicionados separadamente próximo a canais revestidos por células endoteliais para que fosse possível analisar a metástase de células tumorais para vasos sanguíneos. A técnica de bioimpressão de esferoides ainda está sendo estudada e aperfeiçoada. A seleção dos hidrogéis utilizados como “biotintas” para melhor mimetizar a MEC e o desenvolvimento de técnicas de disposição das células e esferoides de forma mais precisa, sem afetar a sua viabilidade, são os principais desafios dessa abordagem (ALBRITTON & MILLER, 2017).

1.3.3.3 Técnica de cultivo em perfusão

O cultivo em perfusão possibilita que as células cresçam em condições dinâmicas com reduzido volume de meio, podendo ser posicionado entre os cultivos em biorreatores e os microfluídicos. O 3Dkube foi desenvolvido pela Kiyatec Company (Greenville, EUA) e é um dispositivo dinâmico de cultura baseado em duas câmaras, contendo cada uma quatro microssuportes porosos onde as células crescem. A viabilidade da cultura 3D é aumentada devido à constante perfusão de meio. Os LiveBox 1 e 2 2 (IVTech Srl, Massarosa, Itália) são biorreatores com câmaras duplas, onde é possível cultivar células em monocamada e 3D (com ou sem suporte), que se conectam por tubos que simulam a conexão entre dois órgãos ou tecidos (CACOPARDO *et al*., 2019). Por exemplo, em uma das câmaras é possível cultivar células de câncer de mama, e em outra, células do sistema imune para avaliar efeitos da imunoterapia. Essa estratégia foi demonstrada na conferência anual *American Association for Cancer Research* (AACR) em 2017 e 2018, de

acordo com a revisão de Brancato *et al*. (2020). No entanto, ainda há limitações para utilização em ensaios automatizados de HTS (BRANCATO *et al*., 2020).

1.3.3.4 Técnica microfluídica

Os cultivos utilizando dispositivos microfluídicos são capazes de simular o microambiente dinâmico tumoral de maneira miniaturizada, possibilitando a distribuição química observada *in vivo* entre os diferentes microcompartimentos que possuem (SARIOGLU *et al*., 2015). As barreiras que limitam um compartimento e outro podem ser físicas ou originárias da utilização de algum suporte poroso que imite a MEC (LANGHANS, 2018). Os esferoides podem ser produzidos nos próprios dispositivos microfluídicos ou produzidos por outras técnicas e introduzidos nos compartimentos (MUNAZ *et al*., 2016).

Nessa técnica, mais complexa do que a de perfusão, as pequenas quantidades de líquido que fluem pelos estreitos canais possuem velocidade e vazão laminar controladas, simulando o fluxo sanguíneo e possibilitando estudos de atividades celulares como proliferação e metástase (ZHANG & NAGRATH, 2013). As forças de cisalhamento observadas nas células endoteliais expostas ao fluxo sanguíneo, um ponto complexo a ser mimetizado *in vitro*, podem ser recapituladas por essa técnica (ANADA *et al*., 2012). Esses dispositivos têm sido amplamente utilizados nos ensaios com fármacos (ZHANG & NAGRATH, 2013), permitindo a contínua aplicação desses compostos, que fluirão de um compartimento a outro contendo células de diferentes tipos.

As vantagens dos dispositivos microfluídicos têm sido relatadas em vários trabalhos que mostram a contribuição significativa dessa abordagem para os cultivos 3D (CHATZINIKOLAIDOU, 2016). Lee *et al*. (2013) relataram maior viabilidade de células tumorais hepáticas quando submetidas à técnica microfluídica em comparação com os cultivos 3D estáticos, e Aw Yong *et al*. (2017) mantiveram o cultivo de esferoides nesses dispositivos por um maior período de tempo. De maneira semelhante, ao simular a perfusão contínua dos fármacos, como acontece *in vivo*, Ruppen *et al*. (2014) demonstraram que os esferoides foram mais resistentes do que as culturas 3D estáticas. O cocultivo nos dispositivos microfluídicos de células tumorais e fibroblastos possibilita mimetizar de maneira mais fidedigna a distância parácrina entre essas culturas e a concentração de FGF observadas i*n*

vivo, sendo um modelo ideal para estudos do papel do FGF na resistência aos fármacos (PATEL *et al*., 2015). Os cultivos microfluídicos podem ser conectados a plataformas de triagem automatizadas, possibilitando que os compostos testados sejam detectados e analisados em pouco tempo com alta precisão (MONTANEZ-SAURI *et al*., 2013). As desvantagens dessa técnica envolvem os complexos processos de fabricação dos dispositivos, que exigem técnicas e condições específicas, e a aplicação em ensaios HTS (MOSHKSAYAN *et al*., 2018).

A miniaturização dos dispositivos microfluídicos permitiu o desenvolvimento dos *organ-on-a-chip* (OC) e *tumors-on-a-chip.* Nos OCs tem-se o cultivo 3D de células de diferentes tipos em diferentes compartimentos ou câmaras de um único *chip*, permitindo a criação de uma plataforma com diferentes modelos de órgãos e tecidos em um sistema microfisiológico interconectado (EDINGTON *et al*., 2018). Podem ser aplicados na avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica de compostos em diferentes órgãos (ALÉPÉE *et al*., 2014; PAMIES; HARTUNG; HOGBERG, 2014; ABACI *et al*., 2017). O pioneiro no campo dos OCs foi o grupo do Prof. Dr. Donald Ingber, diretor e fundador do *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering* de Harvard (Boston, EUA). Recapitularam nos *chips* diferentes órgãos como intestino e pulmão (BHATIA & INGBER, 2014; BENAM *et al*., 2015). Atualmente já se tem relato de ensaios realizados em *chips* com modelos 3D de dois órgãos, como os de fígado-pele (WAGNER *et al*., 2013), fígado-intestino (MASCHMEYER *et al*., 2015), fígado-pâncreas (BAUER *et al*., 2017) e fígado-neuronal (MATERNE *et al*., 2015), e *chips* que acoplam até 4 órgãos, como os de intestino-fígado-neural-rim (RAMME *et al*., 2019) e intestino-fígado-pele-rim (MASCHMEYER *et al*., 2015). A perspectiva é aumentar o número de órgãos e tecidos humanos interconectados no *chip*, gerando os modelos *human-on-a-chip* que possuem potencial de substituir os modelos animais no futuro nos ensaios sistêmicos de compostos (MARX *et al*., 2016).

Por sua vez, os *tumor-on-a-chip* são de grande interesse na área da oncologia, pois possibilitam os estudos dos mecanismos de intra e extravasamento celular durante a progressão do tumor (JEON *et al*., 2015). Pesquisadores da empresa holandesa MIMETAS (Leiden, Holanda) desenvolveram um interessante modelo em *chip* com células de câncer de mama que imita as condições nativas do microambiente tumoral (LANZ *et al*., 2017). Os tumores em *chip*, gerados com diferentes tipos de células tumorais como mama (HAO *et al*., 2018), pulmão

(HASSELL *et al*., 2017) e pâncreas (BEER *et al*., 2017), têm sido amplamente utilizados na avaliação da invasão tumoral, metástase e angiogênese, além de servirem como modelos para a triagem de compostos e estudos de imunoterapia (HACHEY & HUGHES, 2018). A grande vantagem é poder analisar isoladamente ou em conjunto os elementos da matriz extracelular tumoral, incluindo nos dispositivos células estromais, dos sistemas imune e vascular em um microambiente artificial com gradiente de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento (GRAY & MILLS, 2015). Combinada a técnica microfluídica com sistemas que utilizam suportes, como os descritos na seção anterior, é possível até mimetizar as condições biomecânicas da MEC (URBANCYZK; LAYLAN; SCHENKE-LAYLAND, 2020). Atualmente, o grande desafio dos *tumor-on-a-chip* é a falta de escalabilidade para serem aplicados nos ensaios de HTS. Grupos de pesquisa têm focado na miniaturização e automação desses *chips* (TRUJILLO-DE-SANTIAGO *et al*., 2019), e também em ferramentas mais sofisticadas para o monitoramento da viabilidade celular nesses dispositivos (PAN *et al*., 2019).

1.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS CULTIVOS 3D

A caracterização dos esferoides é necessária para a aquisição de informações biológicas relevantes a fim de padronizar as técnicas, métodos e protocolos utilizados na validação da resposta dos esferoides aos compostos testados nos ensaios pré-clínicos (LOVITT; SHELPER; AVERY, 2014; COX *et al*., 2015). Os esferoides tumorais podem ser caracterizados quanto a: (1) parâmetros morfológicos e topográficos; (2) tamanho e forma; (3) heterogeneidade celular; (4) organização celular; (5) produção de proteínas e expressão gênica; (6) padrões de ciclo celular; (7) potencial invasivo e metastático (EVENSEN *et al*., 2013; LAURENT *et al*., 2013; KANG *et al*., 2015; AMANN *et al*., 2014; HÄRMA *et al*., 2014). Quanto às respostas dos tumores aos efeitos terapêuticos dos fármacos, podem-se avaliar a penetração dos compostos, a viabilidade celular e o mecanismo de morte, apoptose ou necrose (DESMAISON *et al*., 2013; CARVER; MING; JULIANO, 2014).

Com o desenvolvimento de tecnologias de cultivo 3D mais complexas, faz-se necessária a adaptação de métodos bem estabelecidos e tecnologias de ponta para a caracterização desses esferoides tumorais. Apesar dos avanços nos estudos que mostram as vantagens do uso dos modelos tumorais 3D, tanto no ambiente

acadêmico quanto no industrial, ainda se utilizam rotineiramente os modelos 2D (SHARMA; HABER; SETTLEMAN, 2010; BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013). Um dos motivos é a limitação quanto a essas ferramentas de análise disponíveis para a caraterização desses esferoides. Muitas vezes, protocolos tradicionalmente utilizados em culturas 2D são inadequados ou precisam ser adaptados para as culturas 3D (FANG & EGLEN, 2017). Ensaios que envolvem troca de meio de cultura ou sucessivas lavagens, por exemplo, são um desafio, uma vez que os esferoides são frequentemente perdidos durante esses processos (MEHTA *et al*., 2012).

O tamanho dos esferoides é uma das principais características analisadas, uma vez que traz diretas implicações quanto às propriedades tumorais mimetizadas, como explicado anteriormente (VIRGONE-CHARLOTTE *et al*., 2017). A técnica mais simples e menos custosa envolve a obtenção de imagens 2D em campo claro, utilizando microscópio invertido de contraste de fase com câmera acoplada. As imagens, então, podem ser analisadas em *software* de acesso público, como o ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) utilizando Macros que automatizam o processo (IVANOV *et al*., 2014; RAGHAVAN, 2015). No entanto, a técnica pode ser tediosa e consumir muito tempo se houver um grande número de imagens a ser analisado. *Softwares* de análise de imagens têm sido desenvolvidos para uma análise mais rápida e precisa, como, por exemplo, o SpheroidSizer disponível no MATLAB (MathWork Inc, Natick, EUA) (CHEN *et al*., 2014), que é capaz de mensurar de maneira automática o comprimento axial maior e menor de várias imagens de esferoides ao mesmo tempo, calculando o volume de cada esferoide de maneira individual. Outros exemplos de *softwares*, pagos ou não, de análise de imagem automatizada disponíveis: MetaXpress (WENZEL *et al*., 2014), AnaSP (PICCININI, 2015), TASI (HOU *et al*., 2018); qVISTA (CELLI *et al*., 2014), AMIDA (HÄRMÄ *et al*., 2014), PCaAnalyser, (HOQUE *et al*., 2013), Phaedra (KRAUSZ *et al*., 2013), Celigo (CELLI *et al*., 2014), Spheroid Analyser (MONJARET *et al*., 2016).

A avaliação da viabilidade celular após a exposição dos esferoides aos tratamentos testados pode ser realizada de maneira qualitativa e quantitativa. Os ensaios de viabilidade qualitativos utilizam marcadores de viabilidade e morte celular. Os mais comuns são o corante Calceína-M e o anticorpo Ki-67, que marcam células viáveis e proliferativas, respectivamente. Tais marcadores podem ser

utilizados junto com Iodeto de Propídio (PI, do inglês *propidium iodide*) e Anexina V, que marcarão as células mortas. Nesse caso, os esferoides podem ser analisados de maneira íntegra em microscópios confocais convencionais com fluorescência e em microscopia de fluorescência baseada em folhas de luz (LSFM, do inglês, *light sheet-based fluorescence microscopy*). Nesse caso, para garantir que esses marcadores penetrem em todas as camadas dos esferoides, protocolos especiais devem ser utilizados (WEISWALD *et al*., 2010; SHAHEEN *et al*., 2016; SMYREK & STELZER, 2017). Alternativamente, os esferoides marcados podem ser dissociados em células individuais, e estas analisadas por citometria de fluxo. No entanto, perde-se nessa abordagem a capacidade de uma análise espacial da distribuição das células marcadas nas camadas do esferoide.

Os métodos quantitativos para avaliação da viabilidade celular lançam mão de métodos diretos e indiretos. Métodos diretos envolvem a contagem de células viáveis utilizando corantes que marcam células mortas, como a solução de Azul de Tripan. No entanto, o desafio desse método envolve o processo de dissociação dos esferoides em células individuais, que pode ser feito com enzimas proteolíticas como a tripsina (PATRA *et al*., 2016). Uma maior concentração de enzima e um maior tempo de dissociação podem ser necessários, uma vez que o alto grau de compactação dos esferoides pode dificultar o processo; no entanto, esse protocolo pode acarretar danos às células e alteração na viabilidade.

Quando os esferoides são muito compactados ou estão embebidos em hidrogéis, a melhor alternativa é o uso de métodos indiretos de quantificação da viabilidade celular, como os ensaios colorimétricos, fluorimétricos e de luminescência. Tais métodos envolvem a utilização de reagentes que quantificam moléculas indicadoras de viabilidade ou produtos de processo de morte celular. Os ensaios que envolvem redução de sais tretazólio, como MTT (brometo de 3-4,5 dimetiltiazol-2, 5 difeniltetrazólio) e suas variantes, e da Resazurina a compostos fluorescentes são os métodos mais comuns e mais baratos (RISS *et al*., 2013). Esses métodos possuem algumas desvantagens, como o alto grau de interferências na leitura e a possibilidade de serem tóxicos dependendo do tipo celular utilizado (UZUNOGLU *et al*., 2010). Com relação às culturas de esferoides, as limitações quanto ao emprego desses métodos estão nos protocolos que possuem grande número de passos e lavagens e baixa penetração dos corantes, dependendo do tamanho e grau de compactação do esferoide, que pode levar a leitura não

representativa do número exato de células viáveis no esferoide (VALLEY *et al*., 2014). Uma alternativa que vem sendo amplamente utilizada em culturas 3D são os ensaios bioluminescentes, que envolvem a quantificação de ATP (do inglês, *adenosine triphosphate*) utilizando a enzima luciferase (MCMILLIN *et al*., 2010; MICHELINI *et al*., 2010). Por serem dependentes de ATP, a bioluminescência dessa enzima é diretamente proporcional ao número de células viáveis (LUKER & LUKER, 2011). As vantagens são que esses ensaios são mais sensíveis, possuem baixa interferência com o meio de cultura, apresentam maiores faixas dinâmicas de sinais quantitativos, e os protocolos são mais simples, com menor número de passos, e mais rápidos (KOSTARELOS *et al*., 2004). Outros ensaios utilizam o mesmo princípio da bioluminescência da luciferase, como o de quantificação da atividade da enzima Caspase-3. Essa enzima tem sua atividade aumentada durante o processo de apoptose celular, sendo um bom parâmetro de morte celular a ser considerado para avaliar a ação dos fármacos.

Métodos convencionais de avaliação de expressão gênica, como PCR (do inglês, *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) em tempo real, e de identificação da presença de proteínas no lisado celular, pelo método semiquantitativo de *Western blotting*, possuem limitações quando aplicados a modelos de esferoides 3D. Uma dessas limitações é a necessidade de um grande número de células por amostra (no mínimo 10.000 células). No entanto, novas versões de *Western blotting* em microescala foram desenvolvidas e são capazes de alta detecção com baixo número de células (PAN; CHEN; JIANG, 2010). Com relação aos ensaios de PCR quantitativos em tempo real (qPCR), novas técnicas vêm sendo relatadas em diversos trabalhos para a otimização da obtenção de DNA e RNA dos esferoides (GONG *et al*., 2015; BARBONE *et al*., 2016; SCHMIDT *et al*., 2016; JUNG *et al*., 2017).

Atualmente, os avanços nas tecnologias de análise de esferoides buscam por métodos que integrem informações quantitativas (tamanho e número de células), funcionais (viabilidade, sinalização, ciclo celular) e qualitativas (microscopias, imunocoloração). Ferramentas capazes de captar células em tempo real utilizando microscópios de força atômica (MFA) são utilizados para monitorar alterações estruturais nas moléculas das células tumorais após o tratamento com fármaco e associar com dados obtidos pelas técnicas de sequenciamento de última geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) para análises de resistência tumoral.

Novas tecnologias envolvendo microscopias de fluorescência também estão sendo desenvolvidas e testadas para monitorar em tempo real a produção de metabólitos pelos esferoides (COX *et al*., 2019). *Softwares* de análise de imagem, como Celigo *Imaging Cytometer* (Celigo, San Mateo, EUA), estão sendo acoplados a citômetros de fluxo para avaliar esferoides em plataformas de HTS (KESSEL *et al*., 2017).

A combinação entre microscópios de alta resolução para captura de imagens e *softwares* de análise automática em massa dessas imagens é o principal foco de grupos de pesquisa que buscam aplicar os esferoides em plataformas de análise de alto conteúdo (HCA, do inglês, *High Content Analysis*) (SIRENKO *et al*., 2015). Essa abordagem possibilita a realização de análises multiparamétricas, ou seja, a análise de várias características dos esferoides simultaneamente (VINCI *et al*., 2012; THAKURI *et al*., 2016). Com base nas imagens adquiridas e armazenadas, os *softwares* são capazes de analisar simultaneamente mudanças no tamanho e morfologia dos esferoides, bem como realizar medições quanto à localização e expressão de marcadores fluorescentes de viabilidade em uma única célula, em um conjunto de células ou em subpopulações específicas que compõem o esferoide (FRAIETTA & GASPARRI, 2016). A combinação das técnicas utilizadas nos métodos HCA com as técnicas de HTS resulta em métodos de triagem de alto conteúdo (HCS, do inglês *high-content screening*) amplamente utilizados no processo pré-clínico de desenvolvimento de novos fármacos, em que é possível analisar simultaneamente diferentes alterações nos esferoides tumorais em resposta ao tratamento de uma gama de compostos candidatos (REID *et al*., 2014; MITTLER *et al*., 2017; CHEN *et al*., 2018).

2. Justificativa

Apesar do crescente uso das tecnologias de cultivo 3D para avaliação da eficácia de compostos com atividade terapêutica, os cultivos convencionais em monocamada (2D) ainda são os modelos *in vitro* mais utilizados nos estudos pré-clínicos, tanto na pesquisa industrial quanto na acadêmica. Há ainda desafios que limitam o uso de esferoides tumorais na indústria farmacêutica. O primeiro diz respeito à necessidade de otimização das técnicas de produção desses esferoides. Um protocolo robusto e versátil deve ser capaz de produzir um número grande de esferoides com diferentes linhagens celulares de câncer, sob condições controladas e reprodutíveis. A uniformidade dos esferoides produzidos também é outro ponto de extrema importância, uma vez que esferoides com características diferentes apresentarão divergências quanto às respostas aos compostos testados, aumentando a variabilidade dos resultados.

Por fim, a capacidade preditiva dos cultivos 3D como modelos pré-clínicos ainda é pouco descrita (FANG & EGLEN, 2017). Ainda são poucos os trabalhos que abordam a possível correlação dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* em culturas 3D com os modelos *in vivo* quanto à resposta a compostos antineoplásicos (GUNNESS *et al*., 2013). Estudos que comparam diferentes sistemas e técnicas de cultivo 3D para geração de esferoides e avaliam o comportamento das células tornam-se relevantes para a consolidação dos modelos 3D nos processos de descobrimento de novos fármacos. Além disso, faz-se necessária a geração de modelos pré-clínicos eficientes para cânceres que não apresentaram nos últimos anos avanços significativos no desenvolvimento de novos fármacos, como é o caso do câncer de bexiga (MAR & DAYYANI, 2019).

Com o objetivo de estabelecer um modelo pré-clínico para o câncer de bexiga, este trabalho se propôs a comparar diferentes técnicas de cultivo 3D com células de câncer de bexiga da linhagem celular RT4, a fim de selecionar técnicas que apresentem bons resultados, principalmente quanto à capacidade de geração de esferoides tumorais e aspectos morfológicos. As técnicas selecionadas foram utilizadas para gerar esferoides a fim de avaliar a sensibilidade destes a fármacos e a expressão de alguns genes comumente superexpressos em tumores sólidos de bexiga. Por fim, esferoides foram gerados com células primárias de tumor de bexiga para avaliação da capacidade preditiva destes quanto a respostas observadas *in vivo*.

3. Objetivos

Avaliar diferentes técnicas de cultivos tridimensionais (3D) a fim de estabelecer um modelo de câncer de bexiga com capacidade de recapitular *in vitro* características do tumor *in vivo.*

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Gerar e caracterizar cultivos 3D utilizando a linhagem celular RT4 em sistemas livres de suporte, utilizando as técnicas de flutuação forçada e gota suspensa;
2. Gerar e caracterizar cultivos 3D utilizando a linhagem celular RT4 em sistemas dependentes de suporte, utilizando suportes poliméricos sólidos e hidrogéis;
3. Selecionar em cada sistema de cultivo a técnica que apresenta os melhores resultados quanto à geração de esferoides RT4.
4. Comparar os esferoides RT4, gerados pelas técnicas selecionadas, com os cultivos em monocamada (2D) quanto à sensibilidade ao fármaco Doxorrubicina;
5. Comparar os esferoides RT4 gerados pelas técnicas selecionadas com os cultivos em monocamada (2D) quanto ao perfil de expressão gênica;
6. Gerar e caracterizar cultivos 3D utilizando células primárias humanas de tumor de bexiga derivadas de modelos PDX;
7. Avaliar sensibilidade dos cultivos 3D à Cisplatina e à Gemcitabina e correlacionar com as respostas obtidas em modelos PDX BL0293 e BL0808.

4. Materiais e Métodos

4.1 CÉLULAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.1.1 Linhagem celular RT4

A primeira etapa do trabalho foi realizada com a linhagem de células de câncer de bexiga RT4 proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). A linhagem foi cultivada em meio de cultura McCoy padrão: McCoy's 5A Modified Medium (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich), 2 mM glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Ao longo do projeto, as células RT4 foram mantidas em monocamada em garrafas estáticas (Corning Inc) de 75 cm^2 com 10 mL de meio de cultura McCoy padrão. Os subcultivos foram realizados por dissociação enzimática utilizando solução 1X Tripsina-EDTA 1X (0,05% de enzima de porco tripsina com ácido etilenodiamino tetra-acético) (Sigma-Aldrich). As células foram criopreservadas em solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, do inglês, *dimethylsulfoxid*) (Sigma-Aldrich) e 90% de SFB (Sigma-Aldrich), em contêiner com nitrogênio líquido a -194 °C. As culturas foram mantidas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C em incubadora MCO-19AIC(UV) (Panasonic, Osaka, Japão). Todos os processos de manipulação foram realizados sob condições estéreis em cabine de segurança biológica Bio-II-Advanced 4 (Azbil Telstar, São Paulo, Brasil) no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LaTecCel) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

4.1.2 Células primárias humanas provenientes de modelos PDX

A segunda etapa do trabalho foi realizada com células primárias humanas de câncer de bexiga provenientes de dois modelos PDX: BL0293 e BL0808. Todos os protocolos deste trabalho que envolveram condicionamento e manuseio de animais foram realizados em conformidade com as diretrizes institucionais da Universidade da Califórnia, Davis (UC Davis, Sacramento, CA, EUA) e aprovadas pelo Animal Use and Care Administrative Advisory Committee da UC Davis. Todos os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos. Os experimentos foram

conduzidos no Laboratório do Professor Dr. Chong-Xian Pan no Departamento de Medicina Interna, Divisão de Hematologia e Oncologia da UC Davis.

4.1.2.1 Modelos PDX BL0293 e BL0808

Os PDXs BL0293 foram desenvolvidos no Laboratório do Professor Dr. Pan com amostra fresca de tumor de bexiga em estágio avançado (mioinvasivo, alto grau) de um paciente sem tratamento quimioterápico prévio (PAN *et al*., 2015). Já o modelo PDX BL0808 (número de referência J000101121) foi obtido pelo The Jackson Laboratory Cancer Center (JAXCC, Sacramento, EUA) e desenvolvido a partir de um tumor de bexiga em estágio avançado de um paciente previamente tratado com quimioterapia neoadjuvante (4 ciclos de Gemcitabina/Cisplatina, 5 meses antes da coleta da amostra). Os animais utilizados em ambos os PDXs foram camundongos fêmeas NSG™ (JAXCC) de 5 a 8 semanas de idade, com peso corporal de 20 a 25 g. Aproximadamente 1 mm^3 de tecido tumoral proveniente dos pacientes foi enxertado nos camundongos via injeção subcutânea no flanco (*UC Davis Institutional Animal Care and Use Committee,* IACUC 19564).

4.1.2.2 Isolamento das células tumorais BL0293 e BL0808

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical (*American Veterinary Medical Association*, AVMA *Guidelines for the Euthanasia of Animals*: 2013), os tumores coletados foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) (Sigma-Aldrich) 1X pH 7,4, colocados em placa de Petri e fragmentados em pequenos pedaços usando uma lâmina de bisturi estéril. Os fragmentos de tumor foram submetidos a digestão parcial com 1% (v/v) de colagenase tipo 1 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 5% (v/v) de Dispase (Thermo Fisher Scientific) por 40 minutos a 1 hora, a 37 °C, agitando a cada 5 minutos. O processo de digestão foi realizado até que o tecido conjuntivo estivesse bem digerido e fosse possível observar grandes aglomerados de células tumorais. A amostra foi então centrifugada a 530 *g* por 5 minutos para remoção da solução enzimática e filtrada em malha de náilon estéril de 100 µm (Milipore®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O material retido na malha foi novamente submetido

a digestão enzimática por 20 minutos para garantir a digestão do tecido conjuntivo remanescente e enriquecer o filtrado com aglomerados tumorais.

Os materiais filtrados foram então submetidos a ciclos de centrifugação de 30 segundos a 1 minuto. A cada ciclo, o sobrenadante, contendo as células estromais individuais (mais leves), foi removido, e o precipitado, contendo os aglomerados de células tumorais (mais pesados), foi suspenso em meio de cultura. Os ciclos de centrifugação foram repetidos até três vezes para garantir a máxima remoção de fibroblastos e outras células estromais da suspensão. Os aglomerados de células tumorais foram então lavados duas vezes com PBS 1X (Sigma-Aldrich) e incubados com solução Tripsina-EDTA 1X (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C até serem completamente dissociados em células individuais. Durante o processo de digestão, isolamento e dissociação, imagens de campo claro foram adquiridas com câmera portátil (AmScope, Irvine, CA, EUA) acoplada ao microscópio de contraste de fase invertido (Olympus, Shinjuku, Japão) do Departamento de Bioquímica e Medicina Molecular da UC Davis, utilizando os aumentos de 4 e 10X.

As células tumorais individualizadas foram mantidas em microplacas de 6 poços com meio de cultura RPMI padrão: RPMI-1640 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 20% (v/v) de SFB (Thermo Fisher Scientific), 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (Gibco™) e 1% (v/v) de L-glutamina (Gibco™). Houve troca de 50% de meio de cultura a cada 48 horas. Para confirmar a presença de células tumorais nos cultivos BL0293 e BL0808, as células foram coradas com soluções de Hematoxilina e eosina (H&E).

4.2 CULTIVO 2D COM CÉLULAS RT4

Para fins comparativos, os cultivos 2D com células RT4 foram caracterizadas quanto ao crescimento e viabilidade celular, número de células apoptóticas e metabolismo celular. As células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços tratadas para adesão com 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço e acompanhadas por 168 horas. Nos tempos de 24, 48, 96 e 168 horas, imagens de campo claro foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc., Minato, Japão) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da

FCFRP-USP, utilizando o aumento de 4X. Imagens da superfície celular foram adquiridas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (seção 4.3.2).

4.3 GERAÇÃO DOS CULTIVOS 3D COM CÉLULAS RT4

4.3.1 Técnica de flutuação forçada

Foram utilizadas microplacas de ultrabaixa aderência (ULA, do inglês, *Ultra-low attachment*) de 96 poços com fundo côncavo (Costar®, Corning Inc.). As células foram plaqueadas em diferentes números iniciais, 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço (correspondentes a 0,5; 1,25; 2,5 e $3{,}75 \times 10^4$ células/mL, respectivamente), em um volume final de 200 µL de meio de cultura McCoy padrão. Os poços localizados nas bordas das microplacas não foram utilizados para o cultivo celular, sendo completados com 200 µL de PBS 1X (Sigma-Aldrich) para minimizar a evaporação do meio de cultura nos poços adjacentes. Os cultivos foram a 37 °C e 5% de CO_2 por 168 horas. A cada 24 horas, imagens de campo claro foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando o aumento de 4X. Imagens da superfície celular foram adquiridas por MEV (seção 4.3.2). Os esferoides RT4 gerados em ULA foram caracterizados quanto aos parâmetros morfológicos, crescimento e viabilidade celular, número de células apoptóticas e metabolismo.

4.3.2 Técnica de gota suspensa

Para a técnica de gota suspensa, foram utilizadas microplacas Perfecta3D® Hanging Drop (HD) de 96 poços (3DBiomatrix, Ann Arbor, EUA). O sistema possui uma bandeja acoplada na parte inferior que possui um reservatório que foi preenchido com PBS 1X (Sigma-Aldrich), minimizando a evaporação ou ressecamento da gota. Células foram plaqueadas em diferentes números iniciais, 200, 500, 1.000 e 1.500 células/poço (correspondentes a 0,5; 1,25; 2,5 e $3{,}75 \times 10^4$ células/mL), em um volume final de 40 µL de meio de cultura McCoy padrão. Meio de cultura fresco (10 µL/poço) foi adicionado às culturas a cada 48 horas para compensar as perdas causadas pela evaporação. Os cultivos foram mantidos a

37 °C e 5% de CO_2 por 168 horas. A cada 24 horas, imagens de campo claro foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando o aumento de 4X. Imagens da superfície celular foram adquiridas por MEV. Os esferoides RT4 gerados em HD foram caracterizados quanto aos parâmetros morfológicos, crescimento e viabilidade celular, número de células apoptóticas e metabolismo.

4.3.3 Microcarregadores

Foram utilizados microcarregadores macroporosos de gelatina Cultispher G (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 g/L. Os microcarregadores foram hidratados em PBS 1X (Sigma-Aldrich) por 1 hora e esterilizados por autoclavagem (120 °C por 20 minutos). Após esterilizados, foram lavados duas vezes com meio de cultura McCoy padrão e acondicionados em meio de cultura a 4 °C *overnight*. O teste piloto para avaliar a adesão das células RT4 aos microcarregadores foi realizado à densidade inicial de $5x10^4$ células/mL em cultivo estático e agitado com diferentes rotações (Tabela 5). Os cultivos foram mantidos a 37 °C e 5% de CO_2 por 96 horas. Amostras foram coletadas em 48 e 96 horas e coradas com solução FDA para marcação fluorescente das células viáveis. As imagens de campo claro e fluorescência foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando os aumentos de 4 e 10X. Os cultivos foram avaliados quanto à adesão ou não ao suporte macroporoso.

Tabela 5 – Sistemas e condições utilizados nos cultivos 3D das células RT4 com microcarregador Cultispher G

Sistema	Tipo de cultivo	Agitação	Volume final
Microplacas ULA 96 poços fundo plano (Costar®, Corning Inc.)	Estático	-	200 µL
Frasco *Spinner* com impelidor tipo bulbo (Techne Keison, Chelmsford, RU)	Agitação magnética	80 rpm	40 mL
Frasco *Spinner* com impelidor tipo pá em vértice (Techne)	Agitação magnética	80 rpm	15 mL
Frascos Erlenmeyer (Corning Inc.)	Agitação mecânica	150 rpm	15 mL
Tubos Spin de polipropileno fundo cônico (Corning Inc.)	Agitação mecânica	150 rpm	5 mL

4.3.4 Matrigel

As células RT4 foram cultivadas em 50% (v/v) de hidrogel natural comercial Matrigel® *Matrix Basement Membrane Growth Factor Reduced* (Corning Inc.) nas concentrações de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço, em microplacas ULA de 96 poços com fundo plano (Costar®, Corning Inc.). Foram plaqueados 50 µL da suspensão celular contendo 50% (v/v) de Matrigel, seguindo-se incubação a 37 °C durante 30 minutos. Após adição de 100 µL de meio de cultura McCoy padrão, os cultivos foram mantidos a 37 °C e 5% de CO_2 por 240 horas, com troca de 50% do meio a cada 2 dias. A cada 48 horas, imagens de campo claro foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando o aumento de 10X. Os esferoides RT4 gerados em Matrigel foram caracterizados quanto aos parâmetros morfológicos, crescimento e viabilidade celular, número de células apoptóticas e metabolismo.

4.3.5 Alginato

As células RT4 foram cultivadas em diferentes números iniciais, 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço, em solução de alginato 2% (v/v) em água Mili-Q. A solução foi preparada dissolvendo 2 g de sal de sódio de ácido algínico (Sigma-Aldrich) em 100 mL de água Mili-Q *overnight* em banho-maria a 37 °C, sob ciclos de agitação intermitente. A gelificação das cápsulas de alginato contendo células RT4 foi feita através do gotejamento da suspensão celular contendo alginato (utilizando pipetas *pasteur* em vidro 15 cm) em solução de cloreto de cálcio 100 mM (Sigma-Aldrich). Foi gerada uma cápsula por poço em microplacas ULA de 96 poços com fundo plano (Costar®, Corning Inc.). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, o cloreto de cálcio foi removido, e as cápsulas lavadas duas vezes com meio de cultura. Os cultivos foram mantidos a 37 °C e 5% de CO_2 por 240 horas, com troca de 50% do meio a cada 2 dias. A cada 48 horas, imagens de campo claro foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando o aumento de 10X. De cada poço, foram adquiridas 5 imagens de forma randomizada. Os cultivos foram analisados quanto à formação ou não de esferoides.

4.3.6 HydroMatrix

As células RT4 foram cultivadas em solução de 0,25% (m/v) de HydroMatrix™ *Peptide Cell Culture Scaffold* (Sigma-Aldrich), de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, a solução estoque a 1% foi ressuspendida em água Mili-Q estéril, e as demais diluições realizadas também com água e solução sacarose 20% (protege as células até que o pH fisiológico seja alcançado). As células foram ressuspendidas com solução de sacarose a 10% e então misturadas às soluções previamente diluídas de HydroMatrix. Foram plaqueados 50 µL da suspensão celular contendo solução de HydroMatrix em microplacas de 96 poços ULA com fundo plano (Costar®, Corning Inc.), seguindo-se a adição de 100 µL de meio de cultura McCoy padrão e posterior incubação a 37 °C e 5% de CO_2 por uma hora para formação do gel. O meio de cultura foi trocado 1 ou 2 vezes durante o período de incubação para regulação do pH. Os cultivos foram mantidos a 37 °C e 5% de CO_2 por 240 horas, com troca de 50% do meio a cada 2 dias. A cada 48 horas, imagens de campo claro foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando o aumento de 10X. Os esferoides RT4 gerados em HydroMatrix foram caracterizados quanto aos parâmetros morfológicos, crescimento e viabilidade celular, número de células apoptóticas e metabolismo.

4.4 GERAÇÃO DOS CULTIVOS 3D BL0293 E BL0808

Para o estabelecimento dos cultivos 3D utilizando células tumorais primárias provenientes dos modelos PDX BL0293 e BL0808, foi utilizada a técnica de flutuação forçada em microplacas ULA de 96 poços com fundo côncavo (Costar® Corning Inc.) e meio de cultura RPMI padrão suplementado com BD Matrigel™ *Basement Membrane Matrix* (BD Biosciences). No ensaio piloto, diferentes concentrações de Matrigel foram testadas – 1,0; 2,0; 5,0 e 10% (v/v) –, utilizando células BL0293 a um número inicial de 1.000 células/poço. Como controle, as células BL0293 também foram cultivadas em meio de cultura RPMI padrão sem suplementação de Matrigel. As culturas foram acompanhadas por 164 horas. A concentração de 5% de Matrigel (v/v) foi selecionada para a realização dos cultivos

posteriores. As células BL0293 e BL0808 foram então plaqueadas a 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 células/poço em meio de cultura RPMI padrão suplementado com 5% de Matrigel (v/v). Após plaqueamento, as microplacas foram centrifugadas a 300 *g* por 10 minutos. Houve troca de 50% do meio de cultura padrão suplementado com 5% de Matrigel a cada 2 dias. As culturas de esferoides BL0293 e BL0808 foram acompanhadas por 240 horas. Imagens de campo claro foram adquiridas com câmera portátil (AmScope) acoplada ao microscópio de contraste de fase invertido (Olympus) do Departamento de Bioquímica e Medicina Molecular da UC Davis, utilizando o aumento de 10X. Os esferoides BL0293 e BL0808 foram caracterizados quanto aos parâmetros morfológicos, crescimento e viabilidade celular, e imunomarcação de células proliferativas e apoptóticas.

4.5 MÉTODOS QUANTITATIVOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.5.1 Análise dos parâmetros morfológicos

Os parâmetros morfológicos (tamanho e forma) dos esferoides foram determinados automaticamente pelo *software* ImageJ, utilizando as imagens de campo claro obtidas durante a geração das culturas. As imagens foram automaticamente processadas utilizando macros do *software*, conforme descrito por Ivanov *et al*. (2014). O diâmetro de Ferret equivale à média da distância entre duas linhas paralelas tangentes à projeção da partícula. Os valores de arredondamento (Fórmula 1), solidez (Fórmula 2) e circularidade (Fórmula 3) foram determinados pelo *software* de acordo com as fórmulas:

$$Arredondamento = 4\times\frac{Área}{\pi\times Maior\ eixo^2} \quad (1)$$

$$Solidez = \frac{Área}{Área\ convexa} \quad (2)$$

$$Circularidade = 4\pi\times\frac{Área}{Perímetro^2} \quad (3)$$

O parâmetro circularidade (Cir), por sua vez, foi utilizado para calcular o índice de esfericidade (IE) de acordo com a Fórmula 4 (KELM *et al*., 2003):

$$IE = \sqrt{Circularidade} \quad (4)$$

Para os cultivos de esferoides RT4 em ULA e HD, foram analisados 4 poços para cada condição (n=4). Para os cultivos de esferoides BL0293 e BL0808, foram analisados 3 poços para cada condição. Os dados foram apresentados como média ± desvio-padrão em gráficos de linha utilizando Origin (OriginLab, Massachusetts, EUA).

Para os cultivos de esferoides em Matrigel e HydroMatrix foram analisados 3 poços para cada condição. De cada poço, foram adquiridas 5 imagens de forma randomizada. Os dados de tamanho foram apresentados para cada esferoide analisado em gráficos de distribuição, com indicação do valor médio ± desvio-padrão (n=4). Para os parâmetros de forma foram estipuladas faixas de valores (entre 0,70 e 0,90; menores que 0,90 e maiores que 0,90), e os dados foram apresentados como média da frequência ± desvio-padrão de esferoides em cada uma dessas faixas nos histogramas (n=3). Os gráficos de dispersão e os histogramas foram gerados utilizando o *software* Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, EUA).

4.5.2 Análise de crescimento e viabilidade celular

4.5.2.1 Quantificação direta

O método de quantificação direta por contagem foi aplicado nos cultivos de células RT4 em monocamada, nos cultivos de esferoides RT4 em ULA e HD, e nos cultivos de esferoides BL0293 e BL0808. Os cultivos em monocamada foram tripsinizados com solução Tripsina-EDTA 1X (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 5 minutos, e os esferoides foram dissociados com solução Tripsina-EDTA 3X (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 15 a 20 minutos. As suspensões de células foram coradas com Azul de Tripan de 0,4% (v/v) (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:1 e contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha) utilizando microscópio LX 400 (Labomed

Inc., Los Angeles, EUA). O número total de células (N) em células/poço foi calculado pela Fórmula 5:

$$N = \frac{Número\ de\ células\ contadas}{q} \times fd \times 10^4 \times volume\ do\ poço \quad (5)$$

Onde (q) é o número de quadrantes, e (fd) é o fator de diluição. A viabilidade celular foi determinada utilizando método de exclusão por Azul de Tripan, de acordo com a Fórmula 6:

$$Viabilidade = \frac{Número\ de\ células\ não\ coradas}{N} \times 100\% \quad (6)$$

Para os cultivos de células RT4 em 2D, ULA e HD, foram analisados 4 esferoides por condição (n=4). Para os cultivos de esferoides BL0293 e BL0808, foram analisados 4 poços por condição (n=4). Os dados foram apresentados como média do número de células ou viabilidade ± desvio-padrão em gráficos de linha utilizando Origin (OriginLab). O fator de expansão para cada condição foi determinado pela razão entre o maior valor médio de número de células atingido no cultivo e o número de células iniciais.

4.5.2.2 Quantificação indireta

O método de quantificação celular indireta por ensaio de luminescência foi aplicado nos cultivos de células RT4 em 2D, Matrigel e HydroMatrix. O reagente CellTiter-Glo® 3D *Cell Viability Assay* (Promega, Madison, EUA) foi adicionado em cada poço em uma proporção 1:1 de meio de cultura. Para induzir lise celular, as amostras foram agitadas vigorosamente por 5 minutos e incubadas a temperatura ambiente por 25 minutos. O ATP liberado pelas células participa da oxidação de luciferina (presente no reagente), que produz luminescência. A quantificação da luminescência, em unidades relativas de luminescência (URL), foi realizada em Leitor de Microplaca Multimodal Synergy™ 2 (BioTek®, Vermont, EUA), com tempo de integração de 0,25 a 1,0 segundo, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP. Os valores de URL gerados foram proporcionais à quantidade de células presente em cada condição.

Foram analisados 3 poços para cada condição (n=3). Os dados foram apresentados como média dos valores de URL ± desvio-padrão em gráficos de linha utilizando Origin (OriginLab). O fator de expansão para cada condição foi determinado pela razão entre o maior valor médio de URL atingido no cultivo e o valor de URL inicial.

4.5.3 Análise de apoptose

4.5.3.1 Quantificação direta

A quantificação direta de células RT4 apoptóticas nos cultivos 2D, ULA e HD foi realizada por citometria de fluxo. Após 120 e 168 horas de cultivo, foi realizada a tripsinização das culturas em monocamada e a dissociação dos esferoides em células individuais; as suspensões foram tratadas com tampão de ligação contendo anexina V 1X conjugada ao 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA) para estimar a porcentagem de células apoptóticas usando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). As amostras foram analisadas em quadruplicata. Foram analisados 4 poços para cada condição (n=4). Os dados foram apresentados como média das porcentagens de células apoptóticas ± desvio-padrão em gráficos de barra utilizando Origin (OriginLab). As comparações entre a porcentagem média de células apoptóticas nos cultivos 2D e 3D nos tempos de 120 e 168 foram realizadas no *software* Prism 7 (GraphPad Software) utilizando o método estatístico ANOVA de uma via com teste *post hoc* Tukey HSD, considerando um nível de significância de 5% ($p<0,05$).

4.5.3.2 Quantificação indireta

A quantificação indireta de células RT4 apoptóticas nos cultivos 2D, Matrigel e HydroMatrix foi determinada por ensaio de luminescência. O reagente Caspase-Glo®3/7 (Promega) foi adicionado em cada poço em uma proporção 1:1 de meio de cultura. Para induzir lise celular, as amostras foram agitadas vigorosamente por 5 minutos e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. A Caspase 3/7 cliva o substrato pró-luminescente liberando aminoluciferina, que por sua vez será usada

como substrato para a luciferase na produção de luminescência. A quantificação da luminescência, em unidades relativas de luminescência (URL), foi realizada em Leitor de Microplaca Multimodal Synergy™ 2 (BioTek®), com tempo de integração de 0,25 a 1,0 segundo, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP. Os valores de URL gerados foram proporcionais à quantidade de células apoptóticas no cultivo. Foram analisados 3 poços para cada condição (n=3). Os dados foram apresentados como média dos valores de URL ± desvio-padrão em gráficos de linha utilizando Origin (OriginLab).

4.5.4 Análise do metabolismo celular

As concentrações de glicose, glutamina e lactato no meio de cultura dos cultivos foram determinadas para os cultivos de células RT4 em 2D, ULA, HD, Matrigel e HydroMatrix, utilizando um analisador bioquímico automático 2700 YSI (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio, EUA) do Laboratório de Cultura de Células do HCFMRP-USP. Foram analisados 4 poços para cada condição de cultivo 2D, ULA e HD (n=4). Para os cultivos em Matrigel e HydroMatrix, foram analisados 3 poços para cada condição (n=3). Os dados foram apresentados como média das concentrações ± desvio-padrão em gráficos de linha utilizando Origin (OriginLab).

4.6 MÉTODOS QUALITATIVOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.6.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para confirmar a presença de células tumorais nos cultivos BL0293 e BL0808, as células foram coradas com soluções de H&E. As células foram cultivadas em CultureSlides de 8 câmaras (Falcon®, Corning Inc.) na densidade de $4x10^4$ células/mL por 24 horas, e fixadas com formaldeído a 4% em PBS 1X (Sigma-Aldrich). As lâminas foram imersas em solução de Hematoxilina Meyer (Sigma-Aldrich) por 30 segundos, lavadas com água deionizada corrente e em seguida imersas em solução de eosina por 30 segundos. A solução de eosina foi produzida com 0,25 mg/L de eosina Y (Sigma-Aldrich) em solução etanol 80% e 0,5% ácido acético glacial. Depois de lavadas com água deionizada corrente, as lâminas foram

desidratadas em ciclos de 5 minutos em etanol graduado: 30, 60, 80, 95 e 100%. Finalmente, as lâminas foram imersas em Xileno I, II e III (5 minutos em solução) e montadas com Fisher Chemical™ Permount™ (Thermo Fisher Scientific) e lamínula. As imagens de campo claro foram adquiridas utilizando câmera digital portátil (AmScope) acoplada a um microscópio de contraste de fase 55i (Nikon Instruments Inc.) do Departamento de Bioquímica e Medicina Molecular da UC Davis, com aumento de 40X.

4.6.2 Análise de superfície celular por microscopia de varredura

Células RT4 foram cultivadas em monocamada em lamínulas (densidade inicial de $5{,}0x10^5$ células/mL) por 96 horas até atingir a confluência de 90%. Para as culturas 3D, as células foram cultivadas em placas ULA (2.500 células/poço) e HD (1.000 células/poço), e os esferoides coletados após 72 horas. As lamínulas e os esferoides foram fixados em glutaraldeído a 2,0% (v/v) (Sigma-Aldrich) por 1 hora. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão de cacodilato (0,2 M, pH 7,2) (Sigma-Aldrich) por 10 minutos, e então imersas em tetróxido de ósmio (1%) (Sigma-Aldrich) por 1 hora. As amostras foram desidratadas usando uma série de soluções de etanol 50%, 70% e 95% por 15 minutos cada; lavadas duas vezes em etanol a 100% e secadas usando o BAL-TEC CPD 030 – *Critical Point Dryer* (BAL-TEC AG, Liechtenstein). As amostras secas foram revestidas com borrifo de ouro, e as imagens de campo claro floram adquiridas pelo MEV High Vacuum JSM-6610LV (JEOL, Akishima, Japão) do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da FMRP-USP.

4.6.3 Marcação de células viáveis com FDA

A solução estoque diacetato de fluoresceína (FDA, do inglês, *fluorescein diacetate*) (Sigma-Aldrich) foi preparada a 10 mg/mL em acetona e armazenada a -20 °C. A solução de trabalho foi preparada a 10 µL/mL em meio de cultura livre de SFB. Após coleta dos microcarregadores, remoção do meio de cultura e lavagem com PBS 1X (Sigma-Aldrich), as amostras foram incubadas por 5 minutos com solução FDA de trabalho. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS 1X (Sigma-Aldrich), deixando as células em solução salina para análise no microscópio

de fluorescência. Imagens de campo claro e fluorescência foram adquiridas de todas as condições em 48 e 96 horas de cultivo com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.), com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando os aumentos de 4 e 10X.

4.6.4 Imunomarcação de células proliferativas e apoptóticas

A presença de células proliferativas e em condição de hipóxia nos esferoides BL0293 e BL0808 foi analisada pela técnica de imunomarcação fluorescente. Os esferoides de 144 horas gerados nos cultivos com 1.000 células/poço foram fixados e permeabilizados com solução PBS 1X (Sigma-Aldrich) contendo 4% de paraformaldeído (PFA, Sigma-Aldrich) e 1% de Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific) por 3 horas a 4 °C. As amostras foram lavadas três vezes com solução PBS 1X contendo 0,3% de Triton X-100 e incubadas com tampão de bloqueio composto por PBS 1X com 3% de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich) e 0,1% Triton, *overnight* a 4 °C. Os esferoides foram então incubados com anticorpos primários anti-HIF-1α (BD Transduction Laboratories™, San José, CA, EUA) e anti-Ki67 humano 8D5 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), ambos produzidos em camundongo, diluídos a 1:250 em tampão de incubação (PBS 1X com 1% BSA e 0,1% Triton X-100) por 48 horas a 4 °C. As amostras foram novamente lavadas com PBS 1X contendo 0,3% de Triton X-100 por cinco vezes. Os esferoides foram incubados por mais 24 horas a 4 °C com o anticorpo secundário anti-IgG (H+L) de camundongo, que foi produzido em cabras e conjugados com FITC (Millipore) diluído a 1:200 em tampão de incubação. As amostras foram novamente lavadas por cinco vezes e coradas com 1 µg/mL de solução Hoechst Stain 33342 (Cell Signaling Technology) para marcação dos núcleos. As imagens fluorescentes foram adquiridas utilizando microscópio confocal para escaneamento a *laser* LSM700 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) do Departamento de Bioquímica e Medicina Molecular da Universidade da Califórnia, Davis, com aumento de 20X.

4.7 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

4.7.1 Tratamento dos cultivos 2D e 3D de células RT4 com Doxorrubicina

A sensibilidade das células RT4 à DOX foi avaliada nos cultivos em monocamada e esferoides em ULA e em Matrigel. Como controle negativo, foram consideradas as culturas que não receberam tratamento, e como controle positivo, as culturas tratadas com 20% de DMSO. Os cultivos 2D foram iniciados com 20.000 células/poço em 100 µl de meio de cultura e cultivados por 24 horas previamente ao tratamento. Os cultivos em ULA foram iniciados com 2.500 células/poço em 100 µl de meio de cultura e cultivados por 72 horas previamente ao tratamento. Os cultivos em ULA foram iniciados com 2.000 células/poço em 100 µl de meio de cultura e cultivados por 192 horas previamente ao tratamento. Soluções 10x de DOX foram preparadas em meio de cultura McCoy nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 µM. Cada poço foi tratado com 10 µL das soluções 10x, chegando a uma concentração final de DOX/poço de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 µM. As imagens de campo claro dos cultivos pré e pós-tratamento foram adquiridas com microscópio invertido Ti-S (Nikon Instruments Inc.) com câmera acoplada do Laboratório de Química Analítica da FCFRP-USP, utilizando os aumentos de 4 e 10X.

Após 24 horas de incubação, o número de células viáveis foi determinado pelo método de quantificação indireta utilizando CellTiter-Glo® 3D *Cell Viability Assay* (Promega), seguindo o protocolo descrito na seção 4.5.2.2. A viabilidade celular em % foi calculada a partir dos valores de URL obtidos em cada condição, de acordo com a fórmula 7.

$$Viabilidade\ celular = \frac{URL\ amostra - URL\ controle\ positivo}{URL\ controle\ negativo - URL\ controle\ positivo} \times 100\% \quad (7)$$

Foram analisados 3 poços para cada condição (grupos tratados e controle) (n=3). Os dados foram apresentados como média das viabilidades ± desvio-padrão em curvas de dose(log)-resposta utilizando o *software* Prism 7 (GraphPad Software). No total, foram realizados 3 experimentos independentes, em dias diferentes

(replicata experimental). Para cada experimento foi gerada uma curva dose-resposta por condição.

4.7.1.1 Cálculo do IC_{50}

A partir das curvas de dose-resposta, os valores de IC_{50} foram calculados automaticamente pelo *software* Prism 7 (GraphPad Software) utilizando a função "Log (inibidor) *vs*. resposta normalizada". Os valores de IC_{50} ± desvio-padrão de cada cultivo foram calculados a partir da média dos valores de IC_{50} obtidos em cada curva de dose-resposta de cada experimento (n=3). As comparações entre os valores de IC_{50} médios dos cultivos 2D e 3D foram realizadas no *software* Prism 7 (GraphPad Software) utilizando método estatístico de soma dos quadrados extra com teste F, considerando um nível de significância de 5% ($p<0,05$).

4.7.2 Tratamento dos cultivos 3D BL0293 e BL0808 com Cisplatina e Gemcitabina

Foi avaliada a sensibilidade dos esferoides BL0293 e BL0808 ao tratamento com Cisplatina, Gemcitabina ou a combinação de ambos os fármacos. Como controle negativo, foram consideradas as culturas que não receberam tratamento, e como controle positivo, culturas tratadas com 20% de DMSO. Esferoides foram gerados com 1.000 células/poço em 100 µl de meio de cultura e cultivados por 144 horas previamente ao tratamento. Soluções 10x de Cisplatina e Gemcitabina foram preparadas em meio de cultura RPMI padrão nas concentrações de 100 µM. Os cultivos foram tratados com 10 µL das soluções 10x dos fármacos, chegando a uma concentração final de fármaco/poço de 10 µM. A dose de fármaco foi determinada com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Professor Pan (GHEIBI *et al*., 2017). Após 24, 48 e 72 horas de cultivo, o número de células viáveis foi determinado pelo método de quantificação indireta utilizando CellTiter-Glo® 3D (Promega), seguindo o protocolo descrito na seção 4.5.2.2. A viabilidade celular em % foi calculada a partir dos valores de URL obtidos em cada condição, de acordo com a fórmula 7. Foram analisados 3 poços para cada condição (grupos tratados e controle) (n=3). No total, foram realizados dois experimentos independentes, em dias diferentes (replicata experimental). A viabilidade celular de cada condição foi

determinada pela média das viabilidades ± desvio-padrão obtidas em cada experimento (n=2). As comparações entre as viabilidades médias foram realizadas no *software* Prism 7 (GraphPad Software) utilizando teste estatístico para amostras não pareadas t de *student,* considerando um nível de significância de 1% (p<0,01).

4.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS CULTIVOS 2D E 3D

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino e o Dr. Lucas Oliveira Sousa do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP. Foram avaliados os níveis relativos dos mRNA codificantes para HIF-1α, TGFβ-1, IFIT5 (do inglês, *interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5*), MDR-1, IL23*,* ALDH1A1 (do inglês, *aldehyde dehydrogenase 1 family member A1*) e H-RAS (do inglês, *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) nas células RT4 cultivadas em 2D e em ULA e Matrigel. O mRNA codificante para a Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle interno para as reações (*housekeeping*) (Tabela 6).

Tabela 6 – Sequência dos *primers* utilizados nos ensaios de expressão gênica

Gene	Sequência	Tamanho (pb*)
HIF-1α	F: CCA GAT TCA GGA TCA GAC ACC	21
	R: TCC AAG TCT AAA TCT GTG TC	20
TGFβ-1	F: CGT GGA GCT GTA CCA GAA ATA C	22
	R: CAC AAC TCC GGT GAC ATC AA	20
IFIT5	F: TTA CCA CTA TGG CCG CTT TC	20
	R: GGG TGA TCT GTC TTT GAC CTT TA	23
MDR-1	F: AAG CCT AGT ACC AAA GAG GCT CTG	24
	R: GGC TAG AAA CAA TAG TFA AAA CAA	24
IL23	F: CCC AGC AAG GCC AAG ATA AA	20
	R: CAA CAT ATG CAG GTC CCA CTA A	22
ALDH1A1	F: GTC AAA CCA GCA GAG CAA AC	20
	R: GGC CCA TAA CCA GGA ACA ATA	21
H-RAS	F: AAG CAA GGA AGG AAG GAA GG	20
	R: GTG GCA TTT GGG ATG TTC AAG	21
GAPDH	F: GAC TTC AAC AGC GAC ACC CAC TC	23
	R: GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G	22

*pb: pares de bases.

As culturas em monocamada foram iniciadas com 20.000 células/poço e mantidas por 24 horas até a coleta das células. Já as culturas em ULA e Matrigel foram iniciadas com 2.500 e 2.000 células/poço e cultivadas por 72 e 192 horas para formação dos esferoides, respectivamente. Foram realizados 3 experimentos independentes com 30 poços para cada condição (n=3). As células e esferoides foram coletados, lavados de 2 a 3 vezes com solução PBS 1X (Sigma-Aldrich) para remoção total do meio de cultura e hidrogel e mantidas a 4 °C.

4.8.1. Extração de RNA

O reagente Trizol® (Life Technology, Carlsbad, EUA) foi adicionada a cada amostra na proporção de aproximadamente 1 mL para cada $2{,}0x10^6$ células. As amostras foram homogeneizadas utilizando *vortex* e em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Após novo processo de homogeneização utilizando o *vortex*, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000g por 5 minutos, e os sobrenadantes coletados e transferidos para um novo tubo onde adicionou-se 500 µL de isopropanol (precipitação do RNA). As amostras contendo RNA precipitado foram homogeneizadas (por inversão do tubo), incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 4°C por 15 minutos. Após a lavagem com 70% de etanol, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 15 minutos para evaporação do etanol.

As amostras de RNA foram então ressuspendidas em 20 µL de água livre de DNAse e RNAse (Sigma Aldrich) e incubadas a 60°C por 10 minutos. Para quantificação do RNA total, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Science) em comprimento de ondo de 230 nm. As amostras foram analisadas também nos comprimentos de onda 260/280 e 260/230 nm a fim de se verificar da presença de possíveis contaminantes nas amostras. Após quantificação, as mostras foram armazenadas a -80°C.

4.8.1. Síntese de RNA

As amostras de RNA extraídas das culturas foram utilizadas para síntese do DNA complementar (cDNA) por meio da técnica de transcriptase reversa, utilizando

o kit *High Capacity cDNA reverse Transcription* (Applied Biosystems™ Thermo Fischer Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. A análise quantitativa de cDNA nas amostras foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e o termociclador Mastercycle Realplex 4S Apparatus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Todas as amostras foram analisadas em triplicata, tanto para os genes de referência como para os genes alvos. Os dados foram apresentados como as expressões médias ± desvio-padrão dos cultivos ULA e em Matrigel relativos à expressão dos cultivos em monocamada (n=3), em gráficos de barra gerados pelo *software* Prism versão 7.0 (GraphPad Software).

5. Resultados e Discussão

Os resultados e a discussão desta tese de doutorado foram sistematizados em duas seções, de acordo com o tipo de célula empregado na geração dos modelos 2D e 3D. Na seção 5.1, foram apresentados os resultados referentes aos modelos desenvolvidos com as células tumorais de bexiga da linhagem celular RT4, realizados nos Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares, coordenado pela Professora Dra. Kamilla Swiech Antonietto, da FCFRP-USP. Na seção 5.2 foram apresentados os resultados referentes aos modelos desenvolvidos com células primárias humanas de tumor de bexiga provenientes de modelos PDX, realizados no Laboratório do Professor Dr. Chong-Xian Pan na UC Davis, em Sacramento (EUA).

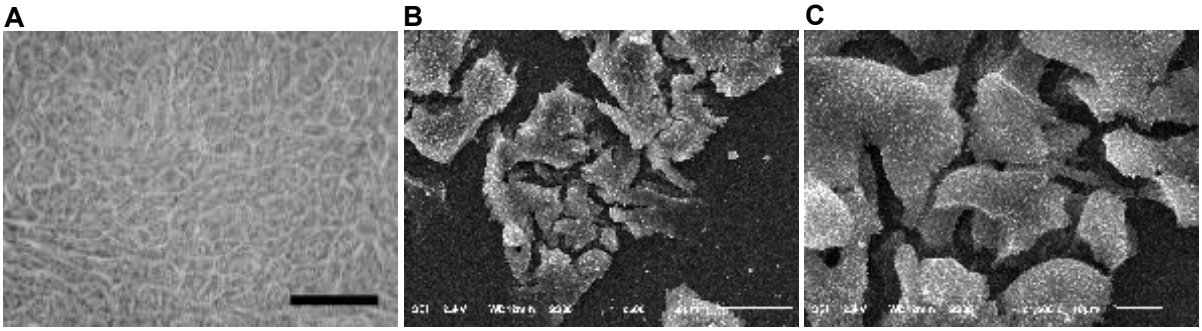
5.1 CULTURAS COM LINHAGEM CELULAR HUMANA DE CÂNCER DE BEXIGA

As interações entre células-células e células-MEC, que afetam o comportamento das células e funções como a proliferação celular, viabilidade, organização e respostas a estímulos externos, são altamente dependentes do arranjo espacial em que as células se encontram (ZANONI *et al*., 2016). Supõe-se que essas características sejam diferentes dependendo do tipo de sistema 3D e técnica de cultivo utilizados (HSIEH *et al*, 2015). Estudos mostram que não há apenas diferença entre os cultivos 2D e 3D, mas também entre os esferoides gerados pelas diferentes técnicas de cultivo 3D existentes. Por essa razão, primeiramente caracterizou-se o cultivo das células RT4 nas tradicionais culturas em monocamada (2D), e posteriormente a capacidade destas de se organizarem em arranjos tridimensionais utilizando diferentes sistemas e técnicas de cultivo. Para os sistemas livres de suportes, foram utilizadas as técnicas de cultivo de flutuação forçada e gota suspensa. Já para os sistemas dependentes de suporte, as técnicas empregadas foram de cultivo em microcarregadores, como exemplo de suporte sólido, e em Matrigel, Alginato e HydroMatrix, como exemplos de hidrogéis. As culturas que foram estabelecidas com êxito foram então caracterizadas quanto aos parâmetros morfológicos (forma e tamanho), crescimento celular e comportamento metabólico. Posteriormente, as culturas de esferoides selecionadas foram avaliadas quanto à sensibilidade ao fármaco DOX e ao perfil de expressão gênica.

5.1.1 Cultivos 2D com células RT4

Por apresentarem variações significativas de tamanho e forma, as células tumorais da linhagem RT4 são caracterizadas como pleomórficas (GILLOTEAUX *et al*., 2010), e a maioria apresenta uma morfologia poliédrica, ou seja, possui uma forma espacial com várias faces e lados de diâmetros diferentes, com núcleo esférico normalmente localizado na região central. São consideradas pequenas, com diâmetro médio em torno de 14 µm quando em suspensão (LIU *et al*., 2014). Quando cultivadas em monocamada (2D), organizaram-se de maneira justaposta, ou seja, bastante unidas com pouca substância intercelular entre elas (Figura 6A). As células permaneceram firmemente aderidas umas às outras, o que dificultou a identificação do limite entre uma célula e outra na monocamada nas imagens obtidas por MEV (Figura 6B). A aparente elevada adesão entre as células possivelmente deve-se às junções intercelulares ou a proteínas integrais de membrana, como as E-caderinas comuns às células de epitélio de bexiga (BRYAN, 2015). Na superfície das células puderam-se observar projeções da membrana plasmática delicadas e curtas chamadas microvilos ou *microspikes* (Figura 6C), típicas de células epiteliais de transição presentes em mais de 90% dos tumores de bexiga (KAUFMAN; SHIPLEY; FELDMAN, 2009; AFRIMZON *et al*., 2016).

Figura 6. Organização espacial e morfologia das células RT4 cultivadas em monocamada

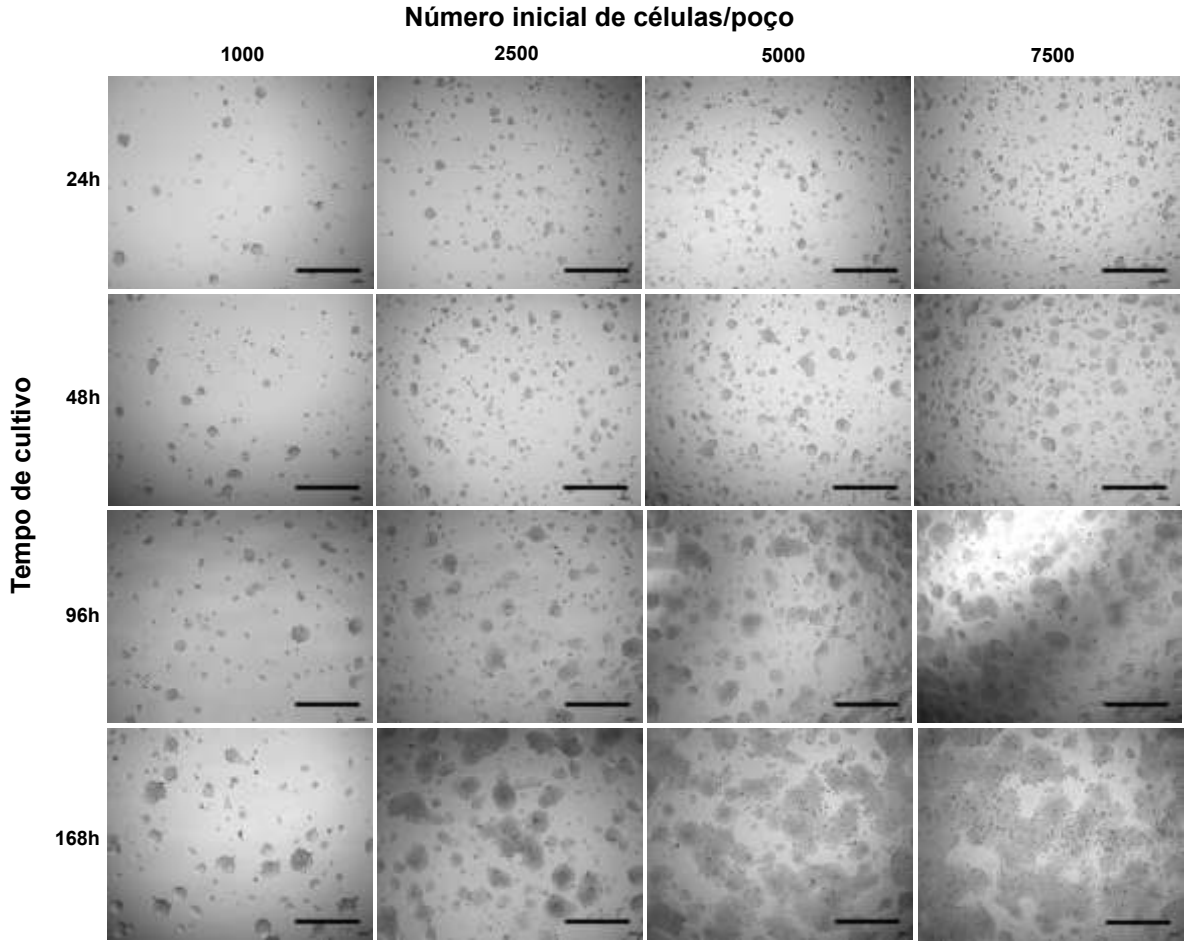


(A) Microscopia de contraste de fase, aumento de 40X, barra de escala = 50 μm. Células cultivadas em monocamada em garrafas estáticas de 75 cm^2 por 96 horas até atingir confluência de 90%. (B) Microscopia de varredura, aumento de 500 X, barra de escala = 50 μm. (C) Microscopia de varredura, aumento de 1500 X, barra de escala = 10 μm. Células cultivadas em monocamada em lamínulas por 96 horas até atingir confluência de 90%.
Fonte: autoria própria.

Quando cultivadas em diferentes concentrações iniciais (1.000, 2.000, 4.000 e 7.500 células/poço) em microplacas de 96 poços tratadas para adesão, observou-se

que as células aderiram facilmente ao fundo do poço já nas primeiras 24 horas de cultivo (Figura 7).

Figura 7. Cultivo em monocamada das células RT4 em microplacas de 96 poços



As células da linhagem RT4 foram plaqueadas com diferentes números iniciais de células, 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço e acompanhadas por 168 horas. Imagens adquiridas em 24, 48, 96 e 168 horas. Microscopia de contraste de fase em campo claro, aumento de 4X, barra de escala = 500 μ m.
Fonte: autoria própria.

Devido à característica de organização justaposta, houve a formação de várias colônias de células espalhadas pela superfície da microplaca nas primeiras 96 horas de cultivo. Apenas após 168 horas de cultivo foi possível observar a união dessas colônias e parcial confluência da superfície do poço nas culturas iniciais com maior número de células (5.000 e 7.500 células). Não houve troca de meio de cultura ao longo do cultivo, o que possivelmente levou à morte de algumas células que se soltaram e permaneceram suspensas (pontos mais escuros) no último dia de cultivo. A capacidade de confluência das células RT4 foi diretamente dependente da

densidade inicial de células utilizada, e esse fator também influenciou no crescimento dessas células, como será discutido na seção 5.2.2.

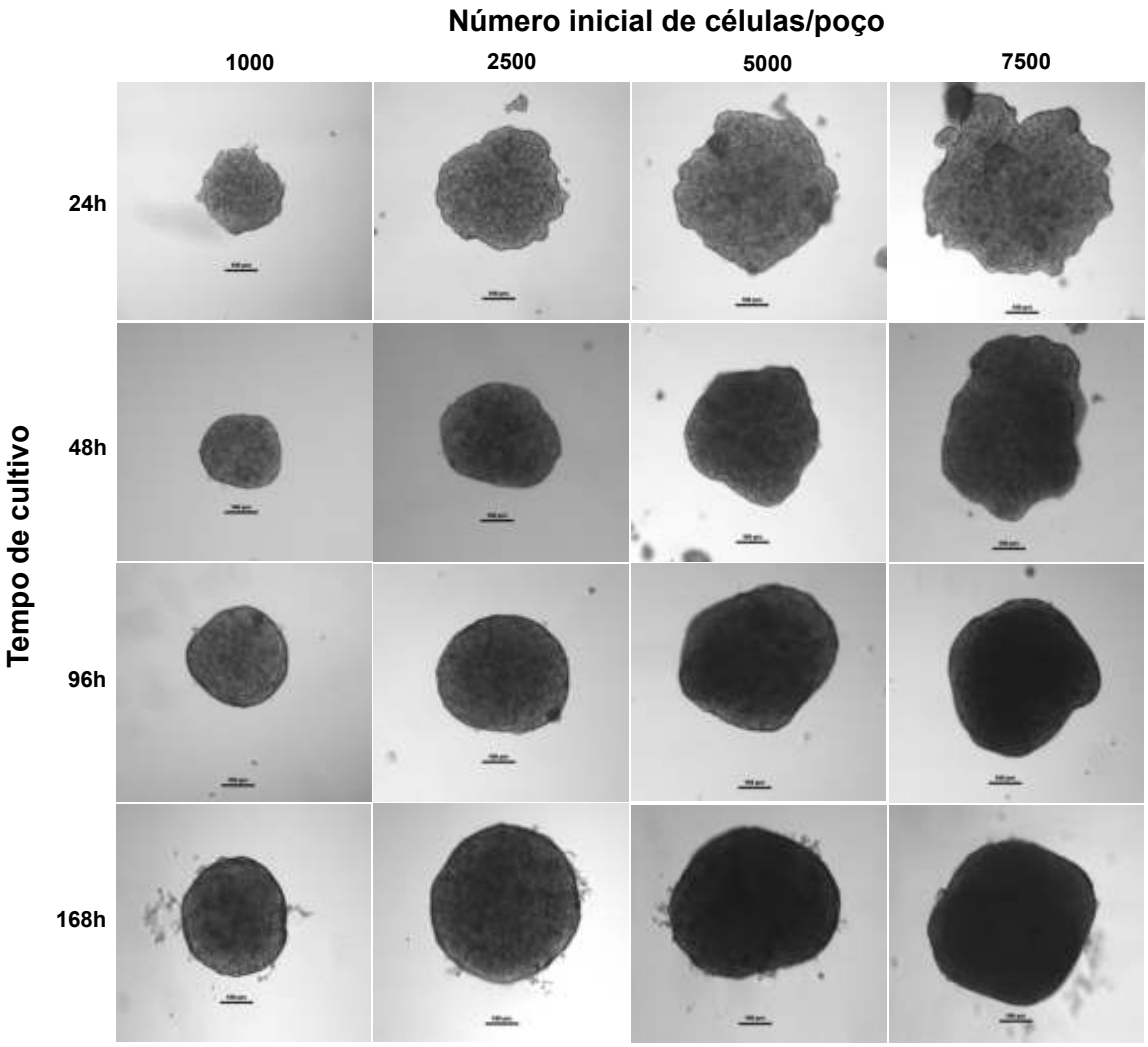
5.1.2 Geração dos cultivos 3D com células RT4

5.1.2.1 Cultivos 3D livres de suportes: flutuação forçada e gota suspensa

Como mencionado anteriormente, os cultivos 3D utilizando sistemas livres de suportes não requerem o uso de nenhum suporte para o crescimento de células (BENIEN & SWAMI, 2014; JAGANATHAN *et al*., 2014). Em condições apropriadas, as células são induzidas a se autoagrupar em aglomerados celulares suspensos, os esferoides (IVASCU & KUBBIES, 2006; LIN & CHANG, 2008; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Essa indução pode ser realizada utilizando diferentes técnicas, sendo as mais comuns a de flutuação forçada e gota suspensa. Para a técnica de flutuação forçada, foram utilizadas microplacas de 96 poços de ultrabaixa adesão (ULA, Costar®, Corning Inc.) com fundo côncavo. Por causa do revestimento com polímero hidrofílico, que inibe as interações células-substrato, as células são capazes de permanecer suspensas e se auto-organizarem em aglomerados celulares. Para o plaqueamento das microplacas ULA, diferentes números iniciais de células foram utilizados, 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço, em um volume final de 200 µL de meio de cultura McCoy. As imagens obtidas com microscópio de contraste de fase mostraram a formação espontânea de um único aglomerado por poço, independentemente do número de células iniciais utilizado (Figura 8). Esse fenômeno deveu-se ao formato côncavo arredondando, ou em “U”, dos poços da microplaca ULA. Nas primeiras 24 horas de cultivo, as imagens revelaram aglomerados celulares com bordas onduladas e suaves deformidades. Somente após 48 horas de cultivo é que se observou uma diminuição no tamanho desses agregados, que se tornaram mais compactos e mais próximos de uma organização esférica característica dos esferoides multicelulares sólidos (IVASCU & KUBBIES, 2006). Zanoni *et al*. (2016) nomearam o intervalo de tempo desse processo de “tempo de esferoidização”, que varia de acordo com o tipo de célula e as condições de cultura. Os esferoides RT4 gerados nas culturas com 1.000 e 2.500 células/poço apresentaram contornos mais lisos até o final de 168 horas de cultivo. Já os

esferoides RT4 iniciados com 5.000 e 7.500 células/poço mantiveram contornos mais ondulados.

Figura 8. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços ULA

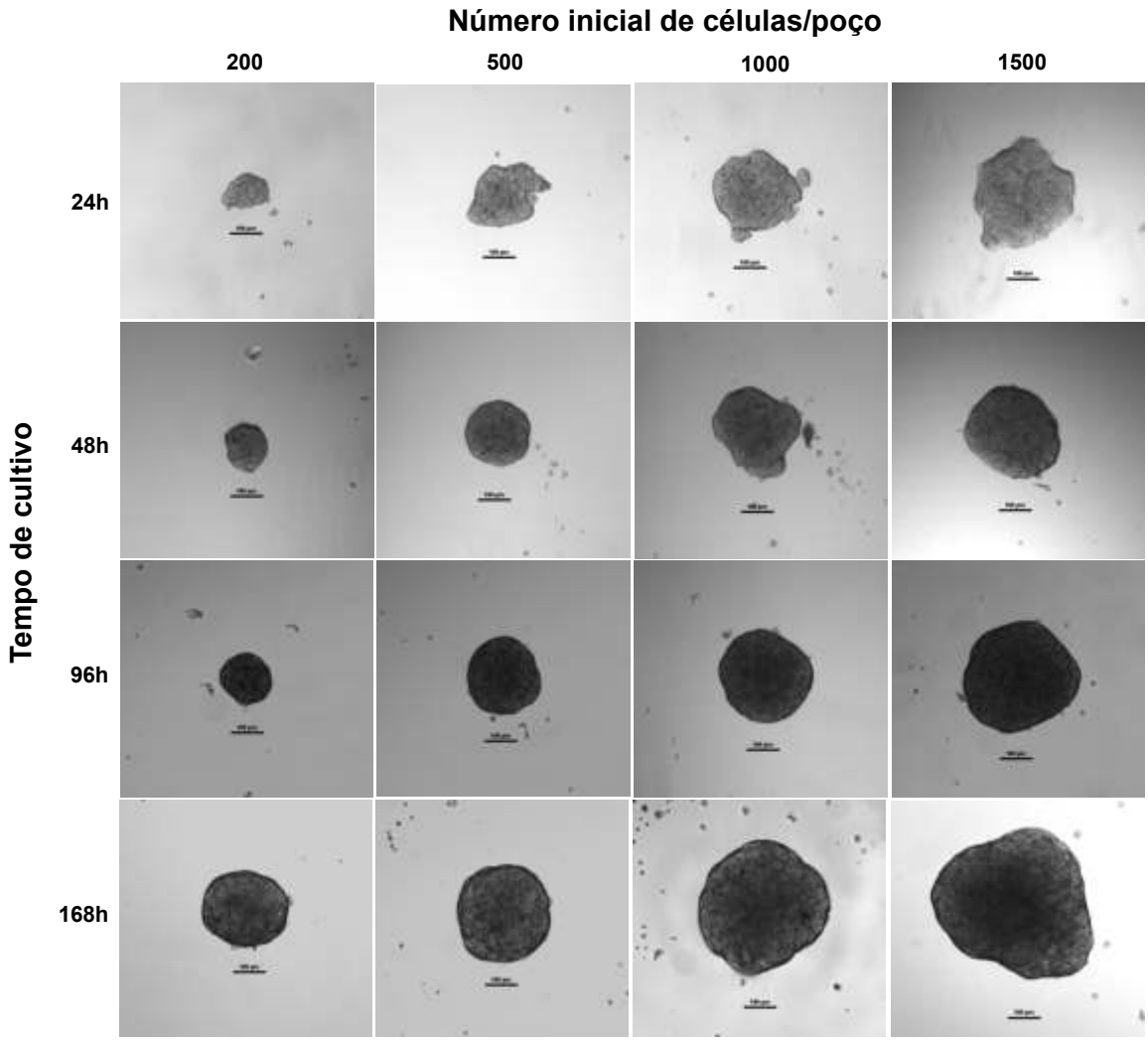


As células da linhagem RT4 foram plaqueadas com diferentes números iniciais de células, 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço, em microplacas de 96 poços ULA e acompanhadas por 168 horas. Imagens adquiridas em 24, 48, 96 e 168 horas por microscopia de contraste de fase de campo claro, aumento de 4X, barra de escala = 100 μ m.
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

Na técnica de cultivo em gota suspensa, foram utilizadas microplacas Hanging-drop (HD) Perfecta 3D (3DBiomatrix) e diferentes números iniciais de células, 200, 500, 1.000 e 1.500 células/poço. O número mais baixo de células, em comparação com a técnica anterior, deve-se ao fato de que o volume máximo de meio utilizado para a formação da gota é de 40 µL. Gotas maiores, portanto, mais pesadas, são menos estáveis e mais vulneráveis a choques mecânicos externos, o que pode aumentar o seu risco de queda. Novamente, as imagens obtidas com

microscópio de contraste de fase mostraram a formação espontânea de um único aglomerado por poço, independentemente do número de células inicial utilizado (Figura 9).

Figura 9. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços HD



As células da linhagem RT4 foram plaqueadas com diferentes números iniciais de células, 200, 500, 1.000 e 1.500 células/poço, em microplacas de 96 poços HD, e acompanhadas por 168 horas. Imagens adquiridas em 24, 48, 96 e 168 horas. Microscopia de contraste de fase em campo claro, aumento de 4X, barra de escala = 100 μ m.
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

Assim como nas culturas em ULA, o “tempo de esferoidização” também foi de 48 horas, como pôde ser observado, em decorrência da diminuição de tamanho dos esferoides RT4 e aparente maior compactação. Os esferoides RT4 formados nas culturas iniciadas com os maiores números de células também apresentaram contornos mais ondulados ao longo do cultivo. A análise dos parâmetros morfológicos desses esferoides será apresentada na seção 5.2.

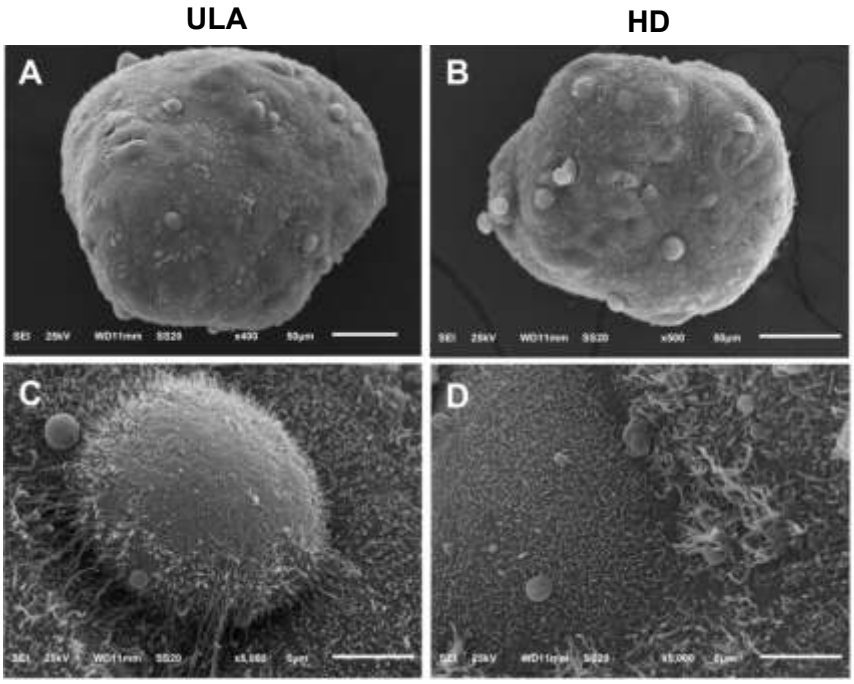
A capacidade de adesão entre as células e formação de agregados pode ser inicialmente explicada pelos fenômenos físicos que regem a interação entre partículas (FOTY & STEINBERG, 2013). Isto é, segundo Yo *et al*. (2018), há uma tendência à formação de estruturas esféricas pelas células quando em suspensão, para minimizar a área de superfície e a energia livre no sistema. Para garantir essa interação intercelular, as células possuem diversas moléculas de adesão denominadas CAMs (do inglês, *cell adhesion molecules*), como a superfamília das E-caderinas, principais mediadoras das interações célula-célula, e as integrinas e proteínas do citoesqueleto, responsáveis pela agregação celular e pela compactação de estruturas tridimensionais (LIN *et al*., 2006).

Lin *et al*. (2006) descreveram que a formação dos esferoides pode ser dividida em pelo menos três fases: agregação, compactação e crescimento. Em uma primeira etapa, agregados celulares frouxos são formados graças às ligações entre as fibras de cadeia longa, ricas em sequências de aminoácidos RGD presentes na matriz extracelular (principalmente colágeno I e fibronectinas), e as integrinas localizadas na superfície da membrana celular.

A compactação desses agregados, por sua vez, ocorre graças às interações entre as caderinas presentes na superfície das membranas celulares, que são superexpressas nos agregados iniciais (SMYREK *et al*., 2019). As proteínas do citoesqueleto, como actina e microtúbulos, também possuem papel fundamental nas etapas de agregação e compactação, formando uma rede pré-tensionada contínua que mantém a estabilidade estrutural do agregado (TZANAKAKIS; HANSEN; HU, 2001; ALHASAN *et al*., 2016). A MEC passa, então, a envolver firmemente as células, tornando os agregados mais rígidos e compactos (SART *et al*., 2014). Na última etapa, de crescimento do agregado, as principais proteínas envolvidas são os microtúbulos e a quinase de adesão focal (FAK. do inglês *focal adhesion kinase*), esta última associada ao potencial metastático das células tumorais (TANCIONI *et al*., 2015). Portanto, todo processo de “esferoidização” requer uma dinâmica reorganização do citoesqueleto e, também, efetivas interações das células com a MEC formada ou, se for o caso, com o suporte utilizado (LASCHKE & MENGER, 2017b).

Os esferoides RT4 gerados nas microplacas ULA e HD com números iniciais de 2.500 e 1.000 células/poço, respectivamente, por 72 horas, também foram analisados por MEV (Figura 10).

Figura 10. Estrutura superficial dos esferoides RT4 cultivados em microplacas de 96 poços ULA e HD



As células da linhagem RT4 foram plaqueadas com 2.500 (ULA) e 1.000 (HD) células/poço. Os esferoides RT4 foram coletados com 72 horas de cultivo. (A) Esferoide RT4 em microplaca ULA, aumento de 400X, barra de escala = 50 μm. (B) Esferoide RT4 em microplaca HD, aumento de 400X, barra de escala = 50 μm. (C) Esferoide RT4 em microplaca ULA, aumento de 5.000X, barra de escala = 5 μm. (D) Esferoide RT4 em microplaca HD, aumento de 5000X, barra de escala = 5 μm. Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

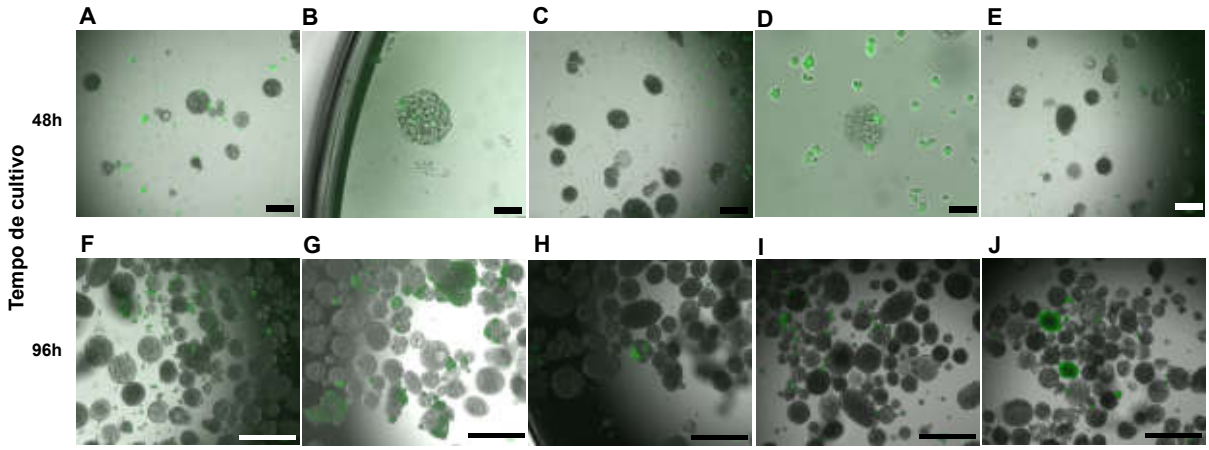
Em ambos os casos, não foi possível distinguir os limites entre as células que compõem o esferoide, resultando em uma superfície de aspecto liso e contínuo possivelmente atribuída à justaposição das células RT4, aparente compactação dos esferoides e à alta secreção de MEC (Figura 10A e B) (LIN *et al*., 2006). Essa conformação possivelmente dificulta a difusão de nutrientes e gases para o interior das células, contribuindo para a possível formação dos gradientes químicos observados nos esferoides tumorais. As células individualizadas espalhadas sobre a superfície dos esferoides são provavelmente células que se duplicaram, mais frequentes nas camadas mais externas, e estão em processo de agregação, ou são células não viáveis que estão se desprendendo. Nas imagens obtidas em ambas as culturas, pode-se observar a superfície das células recoberta quase que totalmente pelos microvilos (Figura 10C e D), com um acúmulo maior do que o observado anteriormente nas culturas 2D (Figura 6B e C). Tais microvilos são estruturas típicas de células epiteliais de transição presentes na bexiga (KAUFMAN; SHIPLEY; FELDMAN, 2009). Além disso, quando se trata de carcinoma de células de

transição, como o carcinoma papilar do qual a linha celular RT4 é derivada, espera-se observar um maior acúmulo desses microvilos (JACOBS *et al*., 1976). Diversos autores já relataram a baixa capacidade das células cultivadas em monocamada de recapitular a abundância dos microvilos observada no tecido nativo (GARDNER & HERBST-KRALOVETZ, 2016; MCCONKEY *et al*., 2016; WANG *et al*., 2016).

5.1.2.2 Cultivos 3D dependentes de suporte sólido: microcarregadores

Os cultivos 3D utilizando suportes buscam a utilização de materiais de origem natural, sintética, semissintética, ou ainda a combinação destes para recapitular a estrutura física e bioquímica da MEC nativa dos tumores sólidos. Mimetizar um tecido é algo complexo e envolve um sistema de interações altamente organizado, não somente entre as células que o constituem, mas também dessas células com outros tipos celulares e a matriz extracelular, incluindo a membrana basal à qual está ligado (ALCARAZ; NELSON; BISSELL, 2004). Uma vez que a estrutura física da MEC pode afetar a organização e função da célula, técnicas de cultura em 3D que incorporam tais matrizes auxiliam na mimetização de um cenário *in vivo*, uma vez que permitem interações célula-matriz. As células cultivadas nesses suportes sólidos podem movimentar-se entre as fibras ou poros do material e aderir a elas, formando estruturas tridimensionais (SOURLA; DOILLON; KOUTSILIERIS, 1996; BARRILA *et al*., 2010). A dinâmica de crescimento das células bem como a formação ou não de estruturas 3D são dependentes, dentre outros fatores, das características do material que compõe o suporte. Utilizaram-se neste trabalho microcarregadores Cultispher G (Sigma-Aldrich) como suporte sólido para geração de esferoides RT4. No ensaio piloto, para definir o sistema de cultivo, as células RT4 foram cultivadas em microplacas de 96 poços e em cultivos dinâmicos utilizando tubos *spin*, frascos Erlenmeyer, frascos *spinner* com bulbo de vidro e frascos *spinner* com pá em vértice (Figura 11).

Figura 11. Microscopia de campo claro e fluorescência do cultivo 3D das células RT4 em microcarregadores Cultispher G



As células da linhagem RT4 foram plaqueadas na densidade de $5x10^4$ células/mL com microcarregadores Cultispher G e cultivadas em diferentes sistemas de cultivo. Após 48 e 96 horas de cultivo, as células foram marcadas com FDA. (A, F): cultivo estático em microplacas de 96 poços; (B, G): cultivo em tubo *spin* sob agitação mecânica de 150 rpm; (C, H): cultivo em frascos Erlenmeyer sob agitação mecânica de 150 rpm; (D, I): cultivo em frasco *spinner* com impelidor tipo bulbo de vidro sob agitação magnética de 80 rpm; (E, J): cultivo em frasco *spinner* com impelidor tipo pá em vértice sob agitação magnética de 80 rpm. Microscopia de campo claro e fluorescência, aumento 10X, barra de escala = 100 μ m (A- E) e aumento de 4X, barra de escala = 500 μ m.
Fonte: autoria própria.

Devido à dificuldade em visualizar as células aderidas aos microcarregadores no microscópio de contraste de fase, as amostras dos cultivos coletadas para análise neste trabalho foram tratadas com solução de FDA. Os microcarregadores Cultispher G são compostos de matriz de gelatina eletricamente neutra e hidrofílica, com tamanhos de 125 a 212 µm de diâmetro após hidratados. Devido à alta porosidade, esperava-se que as células não só viessem a aderir à superfície do microcarregador, como também ocupassem os poros internos, crescendo em um microambiente tridimensional.

Mesmo havendo adesão de algumas células aos microcarregadores, principalmente nos cultivos em tubo *spin* e frasco *spinner* com impelidor tipo pá, a *performance* foi bastante baixa, já que as células tenderam a se agregar entre si formando grandes aglomerados não uniformes em vez de aderir aos suportes. Uma vez que os suportes representam um suporte mecanofisiológico para as células, o processo de adesão ao material seria extremamente importante para que outros aspectos, como a dinâmica de crescimento e a manutenção das funções fisiológicas, fossem garantidos. Diante dos resultados obtidos, concluímos que as células RT4

não demonstraram afinidade pelos microcarregadores Cultispher G e, portanto, estes não foram utilizados nos experimentos de caracterização dos cultivos 3D.

5.1.2.3 Cultivos 3D dependentes de suporte em hidrogéis: alginato, Matrigel e hidrogel de peptídeo

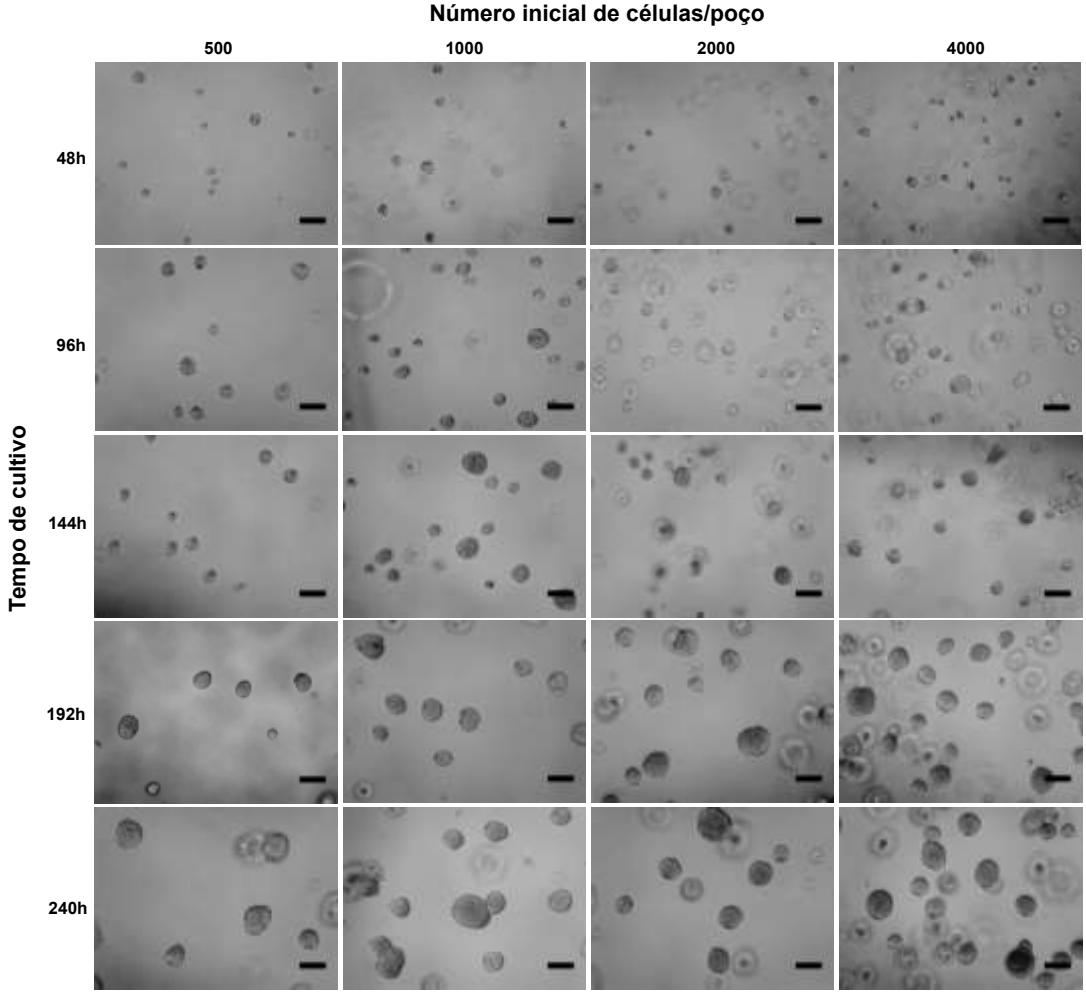
Os hidrogéis são formados por polímeros e copolímeros hidrofílicos que formam um gel com alta quantidade de água e estrutura maleável, criando um microambiente que mimetiza as condições *in vivo*. Os hidrogéis de origem natural utilizados foram o Corning® Matrigel® (Corning Inc) e o alginato (Sigma-Aldrich), e o de origem sintética foi o hidrogel de peptídeo comercial HydroMatrix™ (Sigma-Aldrich). Células em diferentes números iniciais foram dispersadas nas soluções de hidrogéis antes do plaqueamento, possibilitando que crescessem dispersas no gel após o processo de polimerização. Os cultivos foram acompanhados por um período mais longo do que as culturas sem suportes.

Os hidrogéis naturais possuem uma variação bioquímica significativa, e algumas vezes as propriedades dos materiais utilizados são difíceis de serem controladas como nos sintéticos (CUSHING & ANSETH, 2007). No entanto, os hidrogéis naturais ainda possuem uma série de vantagens em relação aos sintéticos devido ao fato de “herdarem” a biocompatibilidade do tecido vivo original, garantindo a promoção da sobrevivência, proliferação, diferenciação e função celular de muitos tipos diferentes de células (EYRICH *et al*., 2007; DAWSON *et al*., 2008). O Matrigel é o hidrogel natural gelatinoso mais utilizado em cultivos 3D por aumentar as interações célula-matriz (DOZMOROVET *et al*., 2006; RINGUETTE-GOULET; BOLDUC; POULIOT, 2018). Produzido comercialmente a partir da secreção de células de sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm, uma das principais desvantagens é o fato de ser de origem animal, limitando o seu uso em algumas áreas. A mistura proteica contém majoritariamente colágeno tipo IV e laminina, principais proteínas presentes na membrana celular basal (ZHANG; GELAIN; ZHAO, 2005). Inicialmente, como um ensaio piloto, as células foram cultivadas em Matrigel puro (100% v/v) e Matrigel diluído 1:1 em meio de cultura McCoy (50% v/v). Nas culturas utilizando 100% de Matrigel, a alta viscosidade do gel formado limitou a formação de agregados tridimensionais com tamanhos superiores a 50 µm (dados

não apresentados), portanto, os experimentos seguiram-se com o cultivo de células RT4 imersas em 50% v/v de Matrigel.

Nas imagens de microscopia de contraste de fase da Figura 12, foi possível observar a formação de pequenos aglomerados celulares já nas primeiras 48 horas de cultivo.

Figura 12. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços com Matrigel 50% (v/v)

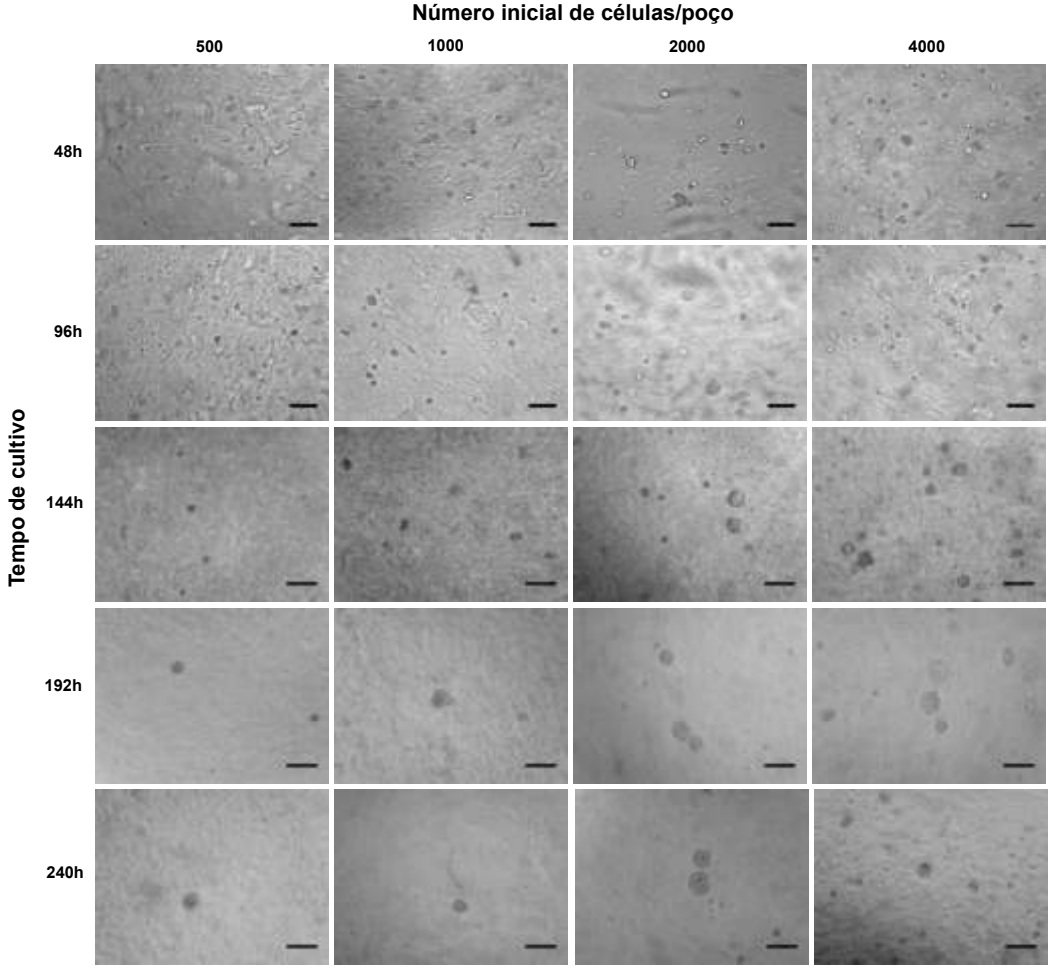


As células da linhagem RT4 foram plaqueadas com diferentes números iniciais de células, 500, 1.000, 2.000, 5.000 e 400 células/poço, em Matrigel 50% (v/v), utilizando microplacas de 96 poços, e cultivadas por 240 horas. Imagens adquiridas a cada 48 horas. Microscopia de contraste de fase em campo claro, aumento de 10X, barra de escala = 100 μ m.
Fonte: autoria própria.

Os esferoides se tornaram mais visíveis com 96 horas de cultivo. Mesmo diminuindo a concentração de Matrigel utilizado, o que poderia facilitar a migração das células através do hidrogel, não se observou a formação de esferoides únicos em cada poço, como observado no sistema de cultivo 3D sem suportes. O resultado

foi a formação de vários esferoides por poço com variação em número/poço, dependendo do número inicial de células utilizadas, porém com aparente uniformidade quanto ao tamanho. Já nos cultivos utilizando o hidrogel natural alginato 2% (v/v), não se observou a formação de grandes agregados celulares durante as 240 horas de cultivo (Figura 13).

Figura 13. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços com alginato 2% (v/v)



As células da linhagem RT4 foram plaqueadas com diferentes números iniciais de células, 500, 1.000, 2.000, 5.000 e 400 células/poço, em alginato 2% (v/v), utilizando microplacas de 96 poços. As culturas foram acompanhadas por 240 horas. Microscopia de contraste de fase em campo claro, aumento de 10X, barra de escala = 100 μ m.
Fonte: autoria própria.

A escolha da concentração de 2% (v/v) foi baseada nos ensaios pilotos com diferentes concentrações de alginato descritas na literatura (dados não apresentados). Notou-se que, quanto mais denso o gel formado, 3 e 4% (v/v), mais limitada foi a formação de agregados celulares. Já os géis formados com 1% (v/v) de

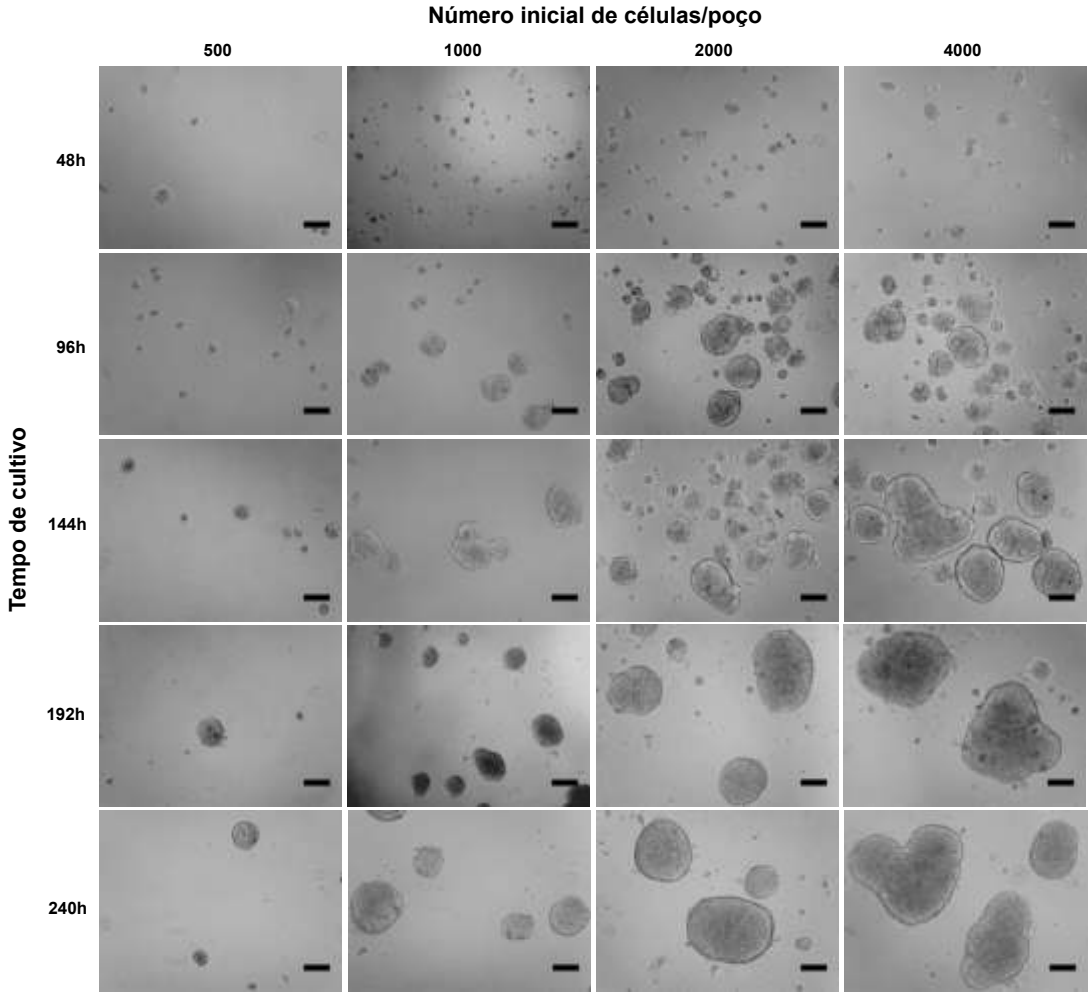
alginato mostraram-se mais frágeis, rompendo-se mais facilmente durante o manuseio das culturas. Utilizado pela primeira vez nos anos 80 em um cultivo com células de pâncreas para transplante (LIM & SUN, 1980), o alginato tem demonstrado grande versatilidade quanto às suas aplicações tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que, além das características típicas de um hidrogel, os suportes de alginato podem ser produzidos com diferentes rigidez e elasticidade. No entanto, não se obteve sucesso ao utilizá-lo como suporte para geração de esferoides RT4.

O HydroMatrix é composto por peptídeos específicos que se auto-organizam em um hidrogel altamente reticulado. Quando expostos a um sal, como cloreto de cálcio, esses géis de peptídeo formam matrizes com poros nanométricos essenciais para assegurar um ambiente 3D para o crescimento das células (Sigma-Aldrich, 2014). A composição do HydroMatrix não é especificada, mas não possui matérias de origem animal, o que traz diversas vantagens já mencionadas. Além de mimetizar as proteínas naturais, pode ser sintetizado com sequências definidas que conferem certas funcionalidades essenciais, como aumento das propriedades mecânicas e biológicas (JONKER; LÖWIK; VAN HEST, 2012), além de trazer alguns benefícios como menores riscos de contaminações e variações de lote (JONKER; LÖWIK; VAN HEST, 2012). As ligações químicas e físicas direcionadas asseguram maior estabilidade às estruturas. As informações a respeito da composição exata do HydroMatrix não estão disponíveis pelo fabricante, mas possivelmente possui a sequência RAD, assim como seu similar PuraMatrix™ (Corning Inc.), possibilitando a adesão das células via receptores de integrina (ZHANG; ZHAO; SPIRIO, 2005).

Conforme apresentado na Figura 14, nas primeiras 48 horas observou-se a formação de alguns pequenos agregados, que com 96 horas de cultivo tornaram-se mais robustos. Novamente houve a formação de vários agregados celulares por poço, assim como nas culturas em Matrigel, porém, de tamanhos maiores, principalmente nas culturas iniciadas com 2.000 e 4.000 células/poço. Diferentemente das culturas anteriores, há maior variação dos tamanhos e menor uniformidade morfológica entre esferoides RT4 de uma mesma condição (número inicial de células e tempo de cultivo). Estudos mostram que a rigidez do material utilizado como hidrogel pode alterar a morfologia e comportamento das células em culturas 3D (MASON *et al*., 2013). Em hidrogéis menos rígidos e com redes interligadas menos densas, como o HydroMatrix, as células tendem a apresentar maior taxa de migração, facilitando a agregação e gerando esferoides de maior

tamanho com geometrias menos esféricas (HUANG *et al*., 2013), como foi observado nas culturas com células RT4.

Figura 14. Cultivos 3D dos esferoides RT4 em microplacas de 96 poços com HydroMatrix 0,25% (v/v)



As células da linhagem RT4 foram plaqueadas com diferentes números iniciais de células, 500, 1.000, 2.000, 5.000 e 400 células/poço, em HydroMatrix 0,25% (v/v), utilizando microplacas de 96 poços. As culturas foram acompanhadas por 240 horas. Microscopia de contraste de fase em campo claro, aumento de 10X, barra de escala = 100 μ m.
Fonte: autoria própria.

Os resultados mostraram que o comportamento de agregação das células RT4 e a consequente formação dos esferoides foram afetados pelos suportes utilizados. Como discutido anteriormente, a adesão entre as células e a formação de esferoides ocorrem em fases (LIN *et al*., 2006). A primeira delas envolve as ligações entre as fibras de cadeia longa, ricas em sequências de aminoácidos RGD presentes na matriz extracelular, e as integrinas localizadas na superfície da membrana celular. Logo, a presença dessa sequência de aminoácidos RGD no HydroMatrix pode ter

sido o motivo pelo qual a agregação das células nesse hidrogel foi mais eficiente (maiores aglomerados em curto espaço de tempo), em comparação com os outros hidrogéis. Em todas as outras fases, as interações das células com a MEC também são de extrema importância para a ocorrência de uma correta agregação e compactação. Portanto, a agregação celular não é só direcionada por um processo espontâneo de interação célula-célula (CRAWFORD *et al*., 2011), mas também pela maneira pela qual as células interagem com as fibras da MEC, que as próprias produzem, e com os suportes, quando cultivadas nesses sistemas (COLLINS *et al*., 2017). Infere-se que é a interação desses mecanismos que rege a auto-organização desses agregados. O alto grau de interação entre as células RT4 e a abundante quantidade de proteínas da MEC que estão presentes no Matrigel podem ter sido responsáveis por garantir a formação de esferoides RT4 com geometria mais esférica.

5.1.3 Caracterização dos cultivos 3D com células RT4

Os cultivos 3D gerados neste trabalho pelas diferentes técnicas foram caracterizados quanto ao tamanho, parâmetros de forma, crescimento e metabolismo, sendo estes dois últimos comparados com resultados obtidos com o cultivo das células RT4 em monocamada.

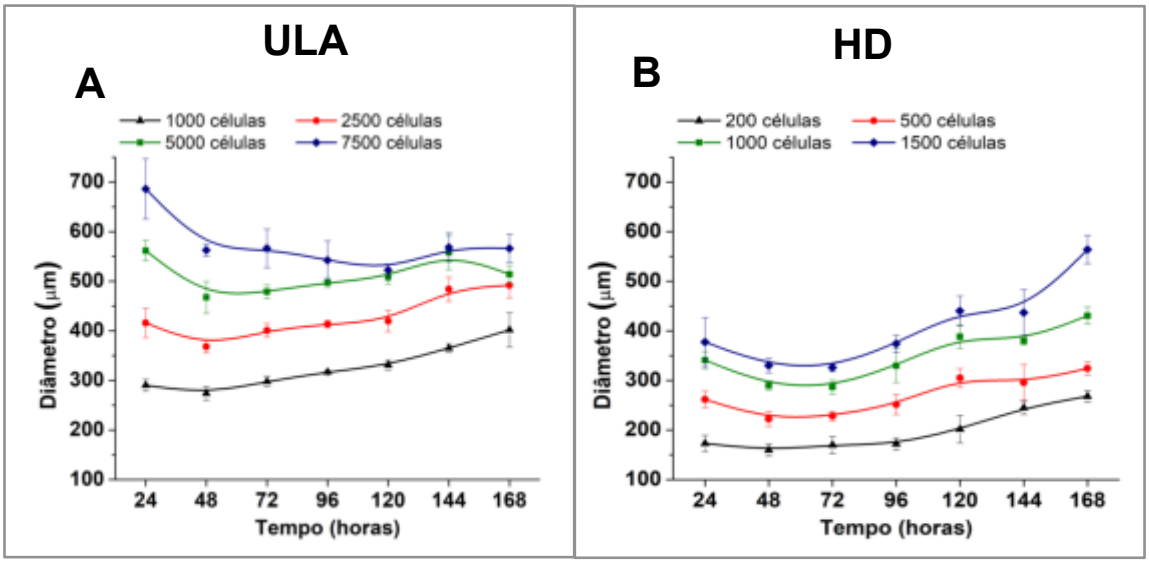
5.1.3.1 Tamanho

De acordo com os dados anteriores, as diferentes técnicas utilizadas causaram variações não só na maneira como essas células se agregaram como também no tamanho e na morfologia (SHI *et al*., 2018). Uma vez que essas características podem afetar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, a geração de esferoides com menor variação de forma e tamanhos homogêneos é um dos fatores mais relevantes para a escolha da técnica (LEE *et al*., 2018b).

Na técnica utilizando microplacas ULA, pôde-se observar aumento no tamanho dos esferoides RT4 ao longo das culturas iniciadas com menor número de células. Os esferoides RT4 formados com 1.000 e 2.500 células/poço apresentaram diâmetro médio inicial de 274,08 ± 13,9 e 368,17 ± 12,40 µm e final de 402,01 ± 34,01 e 492,14 ± 25,32 µm, representando um aumento de 1,38 e 1,18 vezes,

respectivamente (Figura 15A). Já nas culturas iniciadas com 5.000 e 7.500 células/poço, não foram observadas alterações significativas de tamanho ao longo de 168 horas de cultivo. Nessas condições, por outro lado, os esferoides RT4 atingiram tamanhos superiores a 500 µm já nas primeiras horas de cultivo. O decaimento do tamanho dos esferoides RT4 entre 24 e 48h de cultivo, em todas as condições, ilustraram o possível processo de compactação, já discutido anteriormente.

Figura 15. Diâmetro dos esferoides RT4 nas culturas em ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo



(A): Cultivos em microplacas ULA com números iniciais de 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço (B): Cultivos em microplacas HD com números iniciais de 200, 500, 1.000 e 1.500 células/poço. O diâmetro utilizado foi o de Ferret, calculado pelo *software* ImageJ. Dados apresentados como a média dos diâmetros ± desvio-padrão (n=4).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

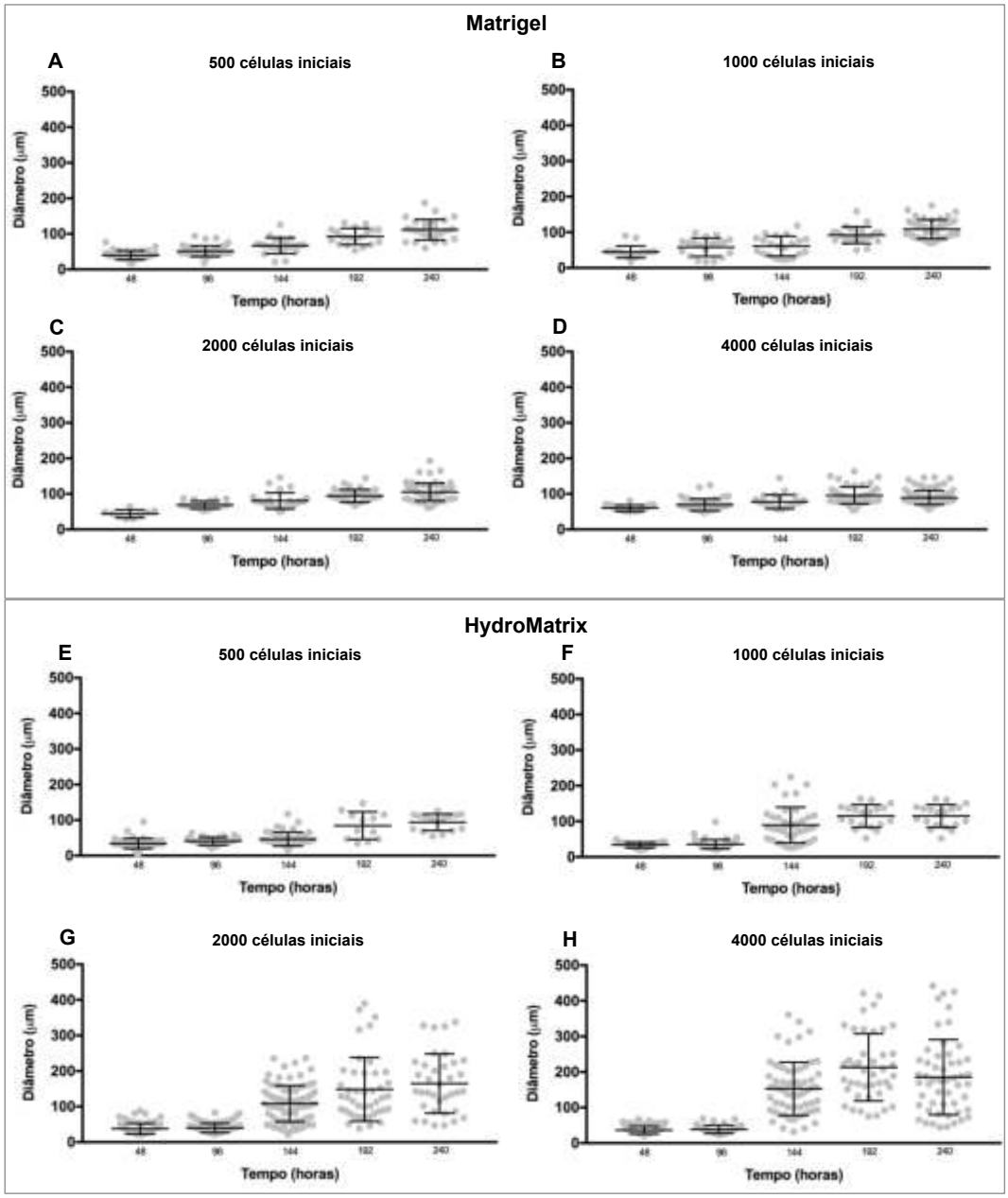
Nas culturas em HD, foram utilizados números menores de células iniciais devido à limitação do volume final de meio de cultura por gota, levando à formação de esferoides RT4 menores dos que as culturas em ULA (Figura 15B). Os esferoides RT4 das culturas iniciadas com 200 células/poço atingiram um diâmetro de apenas 268,13 ± 11,80 µm ao final do experimento, aumento de 1,54 vezes. Já as culturas iniciadas com 500 células/poço geraram esferoides RT4 com diâmetro superior a 300 µm somente após 120 horas de cultura. Os maiores esferoides RT4 foram novamente observados nas culturas iniciadas com número maior de células, 1.000 e 1.500/poço, em que os esferoides RT4 atingiram valores de diâmetro médio de

430,57 ± 17,12 µm e 563,97 ± 28,53 µm, representando um aumento de 1,26 e 1,49 vezes, respectivamente.

Devido à formação de mais de um esferoide por poço nas culturas 3D com suportes, os valores de diâmetro de cada esferoide em cada condição (pontos cinzas) foram apresentados em um diagrama de distribuição para uma análise mais detalhada das variações entre eles (Figura 16). As barras horizontais de cor preta representam a média dos diâmetros em cada condição. Tanto nas culturas em Matrigel quanto em HydroMatrix, houve uma tendência a um aumento no diâmetro médio dos esferoides RT4 ao longo do tempo.

Os cultivos em Matrigel iniciados com 500 células geraram esferoides RT4 com diâmetro médio inicial de 39,81 ± 12,66 µm, chegando, em 240 horas, a um diâmetro médio de 111,72 ± 28,85 µm (aumento de 2,81 vezes) (Figura 16A). Os esferoides RT4 dos cultivos iniciados com 1.000 e 2.000 células apresentaram comportamento similar, com média de diâmetro de 44,77 ± 16,75 µm e 43,81,33 ± 11,20 µm no tempo de 48 horas, e de 108,35 ± 26,55 e 105,07 ± 25,01 µm em 240 horas de cultivo, representando um aumento de 2,42 e 2,39 vezes, respectivamente (Figura 16B e C). Já os esferoides RT4 dos cultivos iniciados com 4.000 células apresentaram uma variação menor do tamanho ao longo do tempo, indo de 59,72 ± 2,58 a 95,27 ± 8,53 µm em 144 horas de cultivo (aumento de 1,49 vezes) (Figura 16D). Pelo gráfico, foi possível observar que a dispersão entre os pontos (valores de diâmetro de cada esferoide RT4 gerados em cada condição) aumenta com o aumento do tempo de cultivo e número inicial de células. No entanto, essa dispersão não é tão grande quando comparada aos gráficos dos cultivos em HydroMatrix (Figura 16E-H), o que significa que a distribuição de tamanho desses esferoides é mais uniforme, corroborando com o observado anteriormente pela análise das imagens de microscopia (seção 5.1.4).

Figura 16. Distribuição dos diâmetros dos esferoides RT4 nas culturas em Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo



(A – D): cultivos em Matrigel com números iniciais de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço, respectivamente. (E – H): cultivos em HydroMatrix com números iniciais de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço, respectivamente. O diâmetro utilizado foi o de Ferret, calculado pelo *software* ImageJ. Pontos acinzentados representam valores de diâmetro de um único esferoide. Linhas pretas representam os valores médios dos diâmetros ± desvio-padrão dos esferoides presentes em 3 poços (n=3).
Fonte: autoria própria.

Nas primeiras 96 horas de cultivo, os esferoides RT4 gerados em HydroMatrix apresentam certa uniformidade nos valores de tamanho (baixa dispersão dos pontos), mas estes se tornam mais variáveis conforme aumentam no decorrer do cultivo, principalmente nas culturas iniciadas com 2.000 e 4.000 células/poço (Figura

16G, H). Ao final de 240 horas de cultivo, os esferoides RT4 das culturas iniciadas com 500 e 1.000 células atingiram diâmetros médios de 94 ± 23,32 (aumento de 2,75 vezes) e 115,01 ± 31,80 µm (aumento de 3,39 vezes), respectivamente. Já as culturas iniciadas com 2.000 e 4.000 células geraram esferoides RT4 com média de diâmetro de 164,77 ± 83,46 e 185,47 ± 90 µm, representando um aumento de tamanho de 4,39 e 5,10 vezes, respectivamente.

Comparando os diferentes sistemas de cultivo 3D, observou-se que as células RT4 se agregaram mais rapidamente e formaram esferoides únicos, com tamanhos que ultrapassaram 300 µm de diâmetro médio nos cultivos ULA (em todos os números iniciais de células após 72 horas) e nos cultivos HD (1.000 e 1.500 células/poço a partir de 48 horas). Já nos cultivos em hidrogel, os esferoides não ultrapassaram a margem de 200 µm de diâmetro médio. Possivelmente, a rede polimérica formada nos hidrogéis impediu a agregação de todas as células em um único esferoide, resultando em diversos esferoides de menor tamanho. Apesar dos menores tamanhos, os esferoides RT4 cultivados nos hidrogéis apresentaram maior aumento ao longo do cultivo do que os esferoides cultivados em ULA e HD. Esse aumento de tamanho pode estar associado tanto a uma alta taxa de proliferação celular nesses esferoides, quanto a uma alta tendência de agregação dos esferoides individuais.

O diâmetro ideal para os esferoides tumorais para uso em ensaios de eficácia de fármacos é ainda amplamente discutido na literatura. Os esferoides com um diâmetro de até 200 µm são capazes de recapitular a interação célula-célula e célula-MEC, e são frequentemente empregados nesses ensaios (FEHLAUER *et al*., 2005; FRIEDRICH *et al*., 2009; LAMBERT *et al*., 2006). No entanto, tais esferoides podem não recriar as condições patofisiológicas necessárias, como o gradiente de oxigênio e nutrientes observado em tumores sólidos de fase inicial, anterior à angiogênese (HARDELAUF *et al*., 2011; PATRA *et al*., 2013; RIFFLE & HEGDE, 2017). Por esse motivo, diversos autores recomendam que os esferoides tumorais tenham diâmetros maiores que 300 µm (RIFFLE & HEGDE, 2017; SANT & JOHNSTON, 2017; SHI *et al*., 2018; VOISSIERE *et al*., 2017). Uma das possíveis consequências de uma difusão não uniforme de nutrientes e gases pelas camadas de células dos esferoides com tamanhos superiores a 300 µm é a geração de região de hipóxia nas camadas mais internas, que está associada à expressão de genes responsáveis pela resistência de tumores sólidos a alguns compostos antitumorais

(CHOUAIB *et al*., 2017; HIRST *et al*., 2018). Já nas camadas mais externas tem-se a presença de células proliferativas, que possuem maior disponibilidade de gases e nutrientes (NATH & DEVI, 2016).

Por outro lado, vários autores consideram importante também delimitar um limite máximo de tamanho dos esferoides que são utilizados nos ensaios de eficácia de fármacos. Conforme o tumor vai aumentando de tamanho no organismo vivo, há o desenvolvimento de capilares que permitem a perfusão sanguínea, a fim de manter as funções celulares no centro, uma vez que a difusão passiva de nutrientes e oxigênio torna-se insuficiente (ALEMANY-RIBES & SEMINO, 2014). Sem um sistema de perfusão *in vitro* que mimetize essa vascularização, os esferoides com diâmetro superior a 500 µm podem desenvolver um núcleo de necrose secundário, o que torna as condições fisiopatológicas complicadas e difíceis de controlar, afetando posteriormente a precisão dos ensaios celulares (INAMDAR & BORENSTEIN, 2011; WAN *et al*. 2016). Por esses motivos, alguns pesquisadores optam por trabalhar com esferoides que apresentem média de diâmetro variando entre 300 e 500 µm (FRIEDRICH *et al*., 2009; HARDELAUF *et al*., 2011; IVANOV *et al*., 2014; PATRA *et al*., 2016; WAN *et al*., 2016; WEN *et al*., 2013).

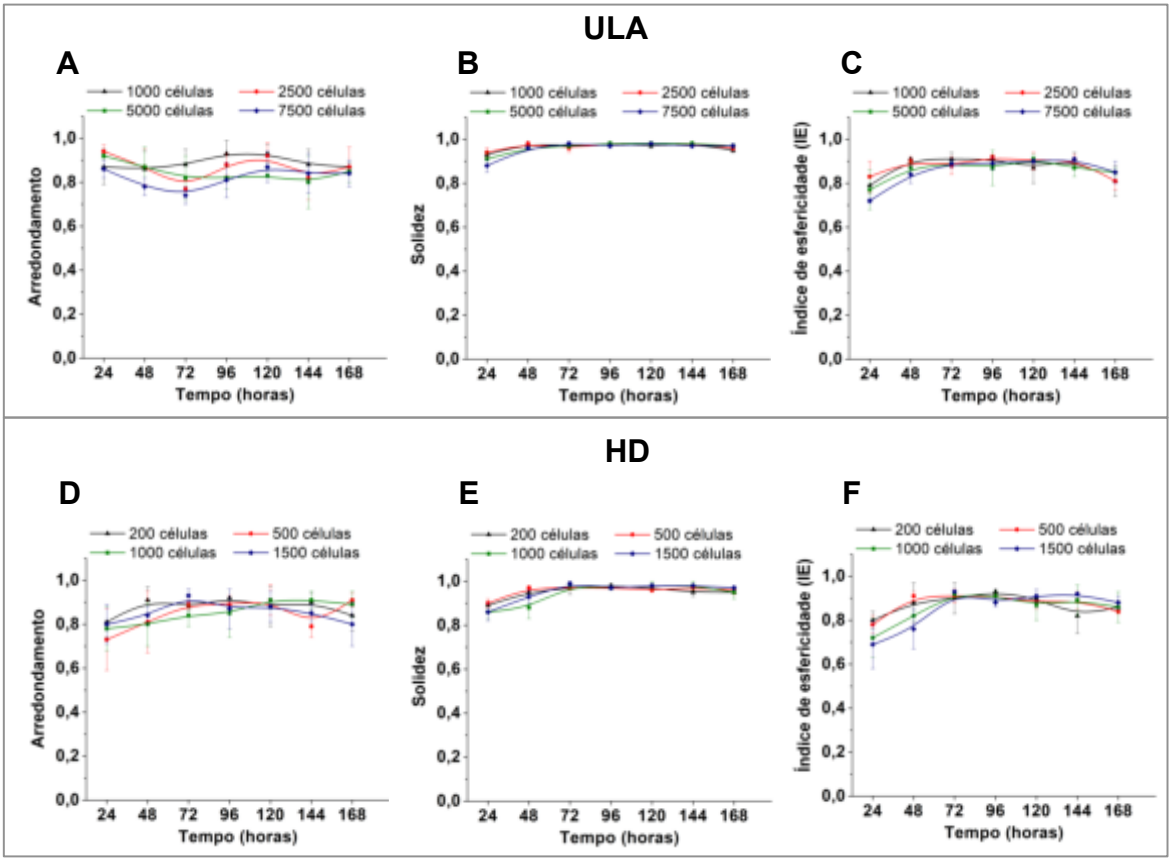
Na técnica de cultivo de flutuação forçada em microplacas ULA, as culturas iniciadas com 1.000 e 2.500 células/poço foram capazes de gerar esferoides RT4 com diâmetros médios na faixa de 300-500 µm, como recomendado por alguns autores. Na técnica de cultivo de gota suspensa em microplacas HD, esferoides RT4 com tamanho nessa faixa foram gerados apenas nas culturas iniciadas com 1.000 e 1.500 células/poço. Com relação aos cultivos em hidrogéis, em nenhuma técnica observaram-se esferoides RT4 com mais de 200 µm.

5.1.3.2 Parâmetros de forma

Além do tamanho, a forma dos esferoides RT4 gerados é um parâmetro relevante na escolha de uma técnica. Esferoides regulares e bem arredondados são mais estáveis quando empregados em ensaios *in vitro* e apresentam menor variabilidade de resposta quando submetidos a ensaios com fármacos (FRIEDRICH *et al*., 2009; THOMA *et al*., 2014; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). O parâmetro arredondamento indica quanto a forma da área projetada dos esferoides se aproxima do formato de um círculo matematicamente perfeito (valores

próximos de 1). Os resultados quanto a esses parâmetros para os cultivos em ULA e HD foram apresentados na Figura 17.

Figura 17. Parâmetros de forma dos esferoides RT4 nas culturas em ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo



(A – C): arredondamento, solidez e índice de esfericidade médio, respectivamente, dos esferoides dos cultivos em microplacas ULA com números iniciais de 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço. (D – F): arredondamento, solidez e índice de esfericidade médio, respectivamente, dos esferoides dos cultivos em microplacas HD com números iniciais de 200, 500, 1.000 e 1.500 células/poço. Os parâmetros foram calculados pelo *software* ImageJ. Dados apresentados como a média dos parâmetros ± desvio-padrão (n=4).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

Os esferoides RT4 gerados nas microplacas ULA apresentaram valores médios de arredondamento maiores que 0,80 durante quase todo o experimento, em todas as condições (Figura 17A). Valores médios de arredondamento mais próximos a 0,90 foram observados apenas nas culturas iniciadas com 1.000 e 2.500 células/poço. Nas culturas em HD, os esferoides RT4 também apresentaram valores médios de arredondamento acima de 0,80 na maior parte do cultivo (Figura 17D). Nessa técnica, houve menor diferença entre os valores médios das condições analisadas.

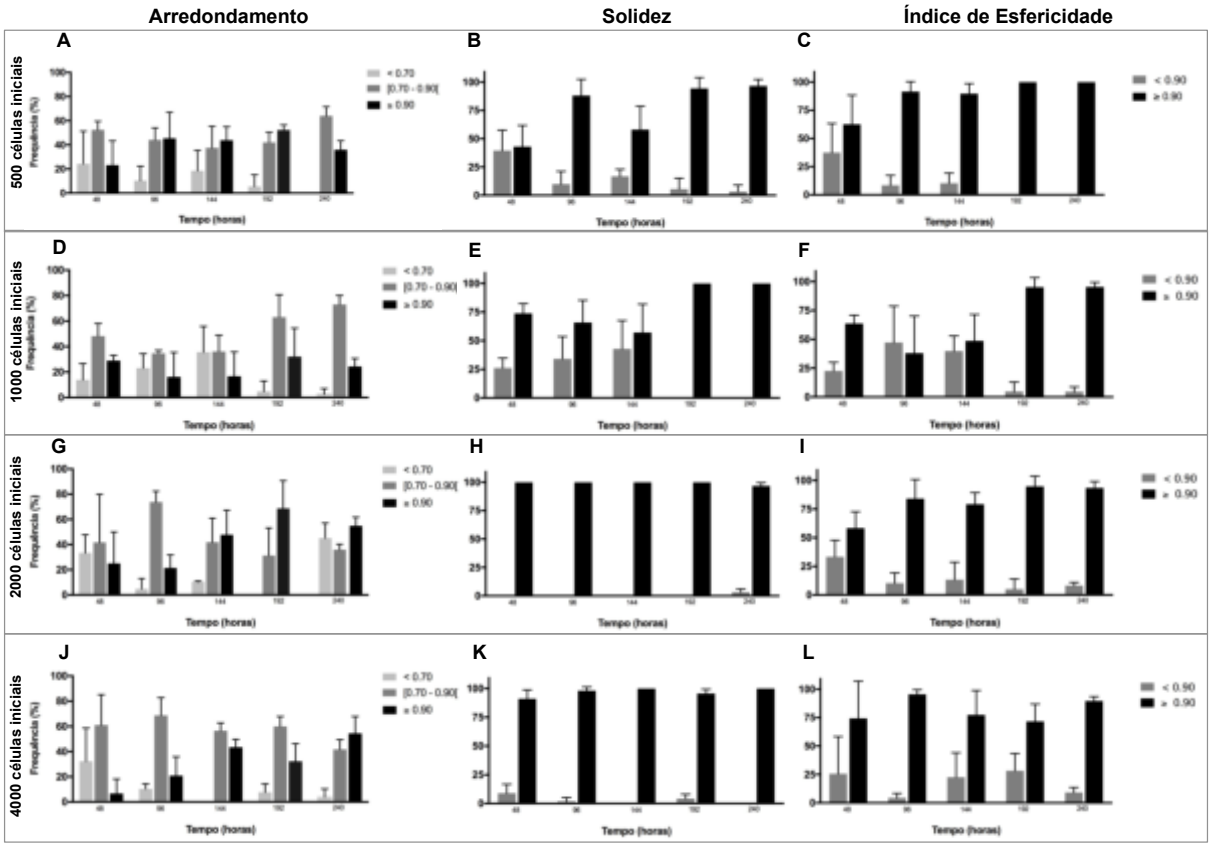
O outro parâmetro de forma analisado foi a solidez, que é um indicador da regularidade da superfície dos esferoides. Segundo Santo *et al*. (2016), os esferoides tumorais são considerados regulares se não apresentarem vincos ou arestas na superfície, e, nesse caso, os valores de solidez são superiores a 0,90. Em todas as condições de cultivo em ULA e HD, os valores de solidez variaram de 0,93 a 0,98 a partir de 48 horas de cultivo (Figura 17B e E).

O terceiro parâmetro analisado foi o índice de esfericidade (IE), que indica quão perto de uma forma de geometria esférica estavam os esferoides RT4 gerados. O parâmetro IE, juntamente com o de circularidade do qual deriva, refere-se à simetria equidistante "ideal" que é desejável que o esferoide tenha. Ou seja, o objetivo seria obter esferoides com distâncias iguais do centro do esferoide para qualquer ponto da superfície. Dessa maneira, é possível a geração de um gradiente de difusão concêntrico de gases, nutrientes e até mesmo moléculas terapêuticas (LEUNG *et al*., 2015). Agregados com formas mais "elipsóidicas" e menos esféricas podem acabar resultando em uma diminuição nessa distância média do eixo mais longo ao seu centro, podendo levar ao desenvolvimento de algumas aberrações, como a presença de dois ou mais núcleos necróticos (ZANONI *et al*., 2016). A definição precisa da forma de um objeto tridimensional necessitaria da captação de imagens desse objeto nos três eixos geométricos, X, Y e Z, utilizando, por exemplo, microscópios confocais. Por ser uma técnica dispendiosa, e devido ao elevado número de amostras que foram analisadas, as imagens foram obtidas por microscopia de contraste de fase, e as imagens 2D geradas foram analisadas quanto ao parâmetro circularidade. A partir dos valores de circularidade e utilizando a fórmula matemática descrita por Kelm *et al*. (2003), foi possível estimar os valores de esfericidade. De acordo com esses valores, os agregados tumorais podem ser classificados como esféricos (IE ≥ 0,90) ou não esféricos (IE < 0,90), e este último formato pode ser subdividido em elipsoides, formatos de "8" e irregulares (ZANONI *et al*. 2016).

Em ambas as culturas, ULA e HD, os esferoides RT4 não apresentaram valores de IE médio superiores a 0,90, mas se mantiveram iguais ou próximos a 0,90 durante a maior parte do cultivo, independentemente do número inicial de células utilizado (Figura 17C e F). Novamente, os baixos valores de IE nas primeiras horas de cultivo nas culturas ULA e HD podem estar associados à geração inicial de agregados mais frouxos, anterior ao período de "esferoidização".

No caso das culturas em Matrigel, os parâmetros de forma foram apresentados em histogramas de classes para melhor visualização e análise dos dados.

Figura 18. Frequência dos parâmetros de forma dos esferoides RT4 nas culturas em Matrigel ao longo de 240 horas de cultivo



(A – C): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 500 células/poço. (D – F): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 1.000 células/poço. (G – I): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 2.000 células/poço. (J – K): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 4.000 células/poço. Os parâmetros foram calculados pelo *software* ImageJ. Dados apresentados como a frequência média dos parâmetros ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: autoria própria.

Nas culturas iniciadas com 500 células/poço em Matrigel, observou-se em todos os tempos maior frequência de esferoides RT4 com valores de arredondamento nas classes de 0,7 a 0,9 e maior que 0,90 (Figura 18A). Em 48h de cultivo, 52,44 ± 7,18% dos esferoides RT4 possuíam valores de arredondamento na classe de 0,7 a 0,90. Já nos tempos de 96, 144 e 192 horas, 45,45 ± 21,58; 43,92 ± 11,15 e 52,38 ± 4,12% dos esferoides RT4 apresentaram valores de arredondamento maiores que 0,90. No fim no experimento, novamente houve

predominância de esferoides RT4 com valores de arredondamento entre 0,7 e 0,90 (64,07 ± 7,56%).

Nas culturas em Matrigel iniciadas com 1.000 células/poço, as maiores diferenças de frequência entre as classes de arredondamento foram observadas em 192 e 240 horas, em que 63,10 ± 17,62 e 73,08 ± 7,8% dos esferoides RT4 gerados possuíam valores de arredondamento entre 0,7 e 0,90, respectivamente (Figura 18D). Nas culturas iniciadas com 2.000 células/poço, houve predominância de esferoides RT4 na classe de 0,70 a 0,90 em 48 e 96 horas (41,67 ± 3,89 e 73,81 ± 8,58%, respectivamente) e de esferoides RT4 com arredondamento maior que 0,90 em 192 e 240 horas (68,72 ± 21,95 e 54,84 ± 11,91%) (Figura 18G). Por fim, nas culturas iniciadas com 4.000 células/poço, houve maior frequência de esferoides RT4 na classe de 0,70 a 0,90 de arredondamento de 48 a 192 horas de cultivo (61,07 ± 24,20; 68,73 ± 14,06; 56,55 ± 6,27 e 59,99 ± 7,92%, respectivamente). Em 240 horas, a predominância foi de esferoides RT4 com valores de arredondamento maiores que 0,90 (54,44 ± 13,47%) (Figura 18J).

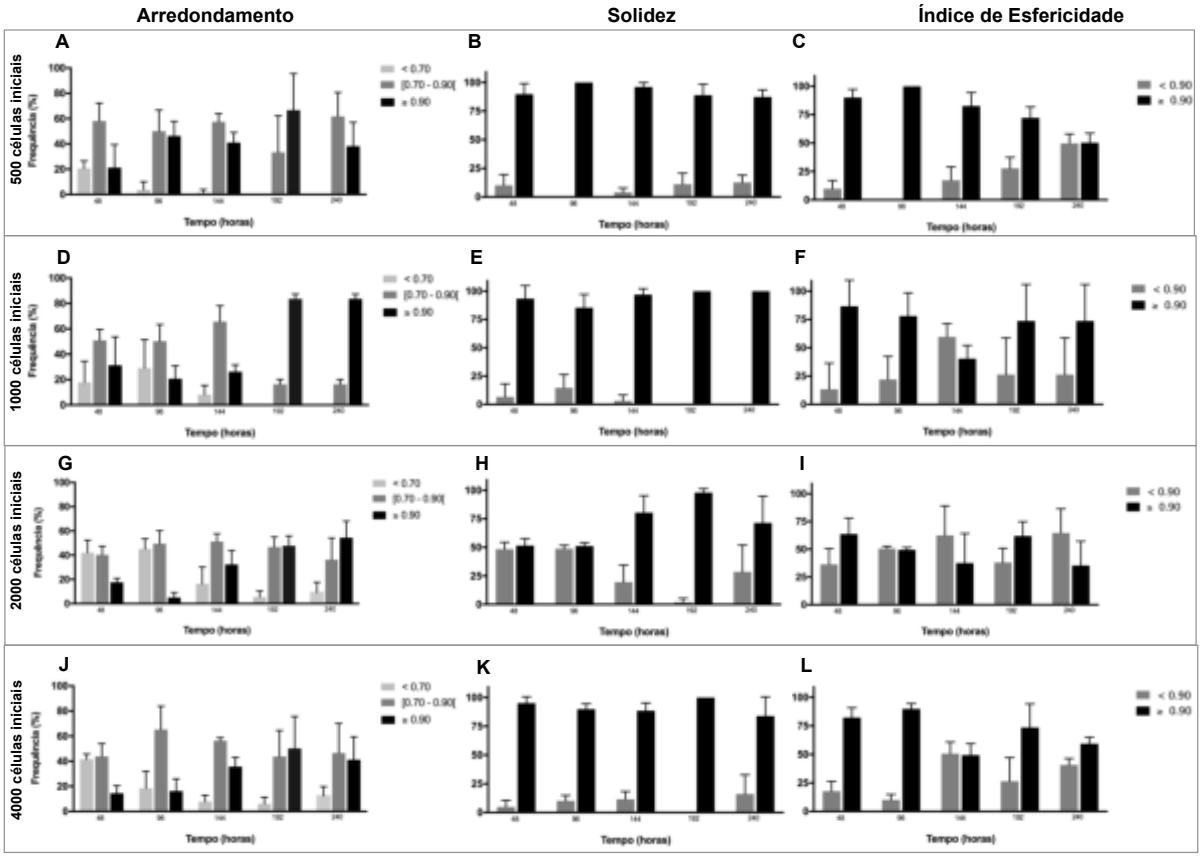
Quanto ao parâmetro solidez, esferoides RT4 com valores inferiores a 0,90 somente foram registrados nos cultivos de 48, 96 e 144 horas das culturas iniciadas com 500 e 1.000 células/poço, com frequência de 10 a 40%. Em todos os cultivos com 2.000 e 4.000 células/poço iniciais, a frequência de esferoides RT4 com valores de solidez superiores a 0,90 permaneceu acima dos 95% (Figura 18B e E).

No início dos cultivos em Matrigel com 500 células/poço, 39,50 ± 18,04% dos esferoides RT4 apresentaram valores de IE inferiores a 0,90, e 43,06 ± 18,79%, valores superiores a 0,90 (Figura 18C). A partir de 96 horas, a frequência de esferoides RT4 com IE inferior a 0,90 diminuiu, e houve predominância de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 (frequência próxima a 100%). Essa predominância de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 foi também observada no início das culturas com 1.000 células/poço (Figura 18F). Houve um equilíbrio entre as duas populações de esferoides RT4 em 96 e 144 horas de cultivo, mas em 192 e 240 horas voltaram a predominar esferoides com IE superior a 0,90, alcançando frequências maiores que 95%. Nas culturas iniciadas com 2.000 células/poço, a frequência de esferoides RT4 com IE inferior a 0,90 decresceu logo nas primeiras 96 horas de cultivo, de 33,33 ± 14,43% para 10,32 ± 3,2% (Figura 18I). De 96 horas até o final do cultivo, a frequência de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 permaneceu acima dos 80%, chegando a 94,87 ± 8,88% em 240 horas. Nas culturas

iniciadas com 4.000 células/poço, a frequência de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 foi de 74,40 ± 32,75 e 95,58 ± 3,97% nos tempos de 48 e 96 horas, respectivamente (Figura 18L). Essa frequência se manteve por volta de 70% em 144 e 192 horas e alcançou 89,68 ± 3,82% ao final das 240 horas de cultivo.

A frequência de esferoides RT4 com valores de arredondamento nas classes de 0,70 a 0,90 também foi predominante nas culturas em HydroMatrix iniciadas com 500 células/poço (58,16 ± 14,14; 50,00 ± 16,67; 57,47 ± 6,48 e 61,82 ± 18,90% nas culturas de 48, 96, 144 e 240 horas, respectivamente), com exceção do tempo de 192 horas, em que a predominância foram esferoides RT4 com valores de arredondamento maiores que 0,90 (66,67 ± 28,87%) (Figura 19A). Nas culturas iniciadas com 1.000 células/poço, a frequência de esferoides RT4 com valores de arredondamento entre 0,7 e 0,90 foi predominante nos tempos de 48, 96 e 144 horas (50,95 ± 8,61; 50,29 ± 13,15; 65,71 ± 12,45%, respectivamente) (Figura 19D). Já ao fim dos experimentos, 192 e 240 horas, as maiores frequências foram de esferoides RT4 com valores de arredondamento maiores que 0,9 (83,61 ± 3,76 e 82,78 ± 3,00%, respectivamente). As frequências de esferoides RT4 com valores de arredondamento menores que 0,70 e entre 0,7 e 0,90 foram muito próximas no início do cultivo, 48 e 96 horas, nas culturas iniciadas com 2.000 células/poço (Figura 19G). Em 144 horas, houve predominância de esferoides RT4 entre 0,70 e 0,90 (51,26 ± 6,53%), e em 192 horas a frequência de esferoides RT4 com valores de arredondamento entre 0,70 e 0,90 e maiores que 0,90 foram praticamente iguais (aproximadamente 47%). Em 240 horas, houve predomínio de esferoides RT4 com arredondamento maior que 0,90 (54,44 ± 23,65%). Um comportamento semelhante ao início das culturas com 2.000 células/poço foi observado nas culturas iniciadas com 400 células/poço, onde se observou uma frequência similar entre as classes de valores menores que 0,70 e de 0,70 a 0,90 (aproximadamente 43%) (Figura 19J). Em 96 horas, a predominância foi de esferoides RT4 com arredondamento entre 0,70 e 0,90 (65,29 ± 18,56). Em 192 horas, a frequência das classes de 0,70 a 0,90 e maiores que 0,90 se aproxima e se mantém semelhante até o fim do cultivo com pouca variação (aproximadamente 40%).

Figura 19. Frequência dos parâmetros de forma dos esferoides RT4 nas culturas em HydroMatrix ao longo de 240 horas



(A – C): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 500 células/poço. (D – F): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 1.000 células/poço. (G – I): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 2.000 células/poço. (J – K): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides com número inicial de 4.000 células/poço. Os parâmetros foram calculados pelo *software* ImageJ. Dados apresentados como a frequência média dos parâmetros ± desvio-padrão nas classes: valores menores que 0,70, entre 0,70 e 0,90 e maiores que 0,90 (arredondamento); valores menores que ou maiores que 0,90 (solidez e índice de esfericidade) (n=3).
Fonte: autoria própria.

Nas culturas em HydroMatrix iniciadas com 500, 1.000 e 4.000 células/poço, esferoides RT4 com solidez inferior a 0,90 não ultrapassaram 15% de frequência em todos os tempos analisados, predominando também esferoides RT4 com solidez maior que 0,90 (Figura 19B, E e K). Já nos cultivos em HydroMatrix iniciados com 2.000 células/poço, a população de esferoides RT4 ficou dividida igualmente entre as duas classes nos tempos de 48 e 96 horas. Os esferoides RT4 com valores de solidez maiores que 0,90 voltaram a predominar a partir de 144 horas com frequência superior a 75% (Figura 19K).

Por fim, em relação aos valores de IE nas culturas em HydroMatrix, nos cultivos iniciados com 500 células/poço, as frequências de esferoides RT4 com IE

superior a 0,90 foram maiores que 90% nas primeiras 96 horas de cultivo (Figura 19C). Essa frequência decresceu ao longo do cultivo, e em 240 horas havia uma população mista de esferoides, dos quais 50% apresentaram valores de IE superiores a 0,90, e 50%, inferiores a 0,90. No início das culturas com 1.000 células/poço, a predominância foi de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 (frequência de aproximadamente 75%) (Figura 19F). No entanto, em 144 horas, observou-se a predominância de esferoides RT4 com IE inferior a 0,90 (59,66 ± 11,174%). A frequência de esferoides RT4 com valores de IE superiores a 0,90 voltou a predominar em 192 e 240 horas, mas não ultrapassou os 75%. Nas culturas iniciadas com 2.000 células/poço, houve, de maneira geral, uma ausência de predominância entre uma das classes de esferoides (Figura 19, I). Nos cultivos de 48 e 192 horas, a predominância foi de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 (63,69 ± 14,32 e 61,94 ± 12,90%, respectivamente). Já nos cultivos de 96 horas, houve igualdade entre as frequências (50%), e nos cultivos de 144 e 240 horas, a predominância foi de esferoides RT4 com IE inferior a 0,90 (62,45 ± 26,65 e 64,63 ± 21,80%, respectivamente). Nas culturas iniciadas com 4.000 células/poço, houve predominância de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 nas primeiras 96 horas de cultivo, com frequências próximas a 90% (Figura 19L). Essa frequência decaiu em 144 horas, atingindo 49,33 ± 10,12% e se igualando à frequência de esferoides RT4 com IE menor que 0,90. Ao final de 192 e 240 horas, a frequência de esferoides RT4 com IE superior a 0,90 foi de 73,57 ± 201,72 e 59,35 ± 5,71%, respectivamente

Com base em todos os resultados apresentados, os baixos valores de arredondamento observados durante as primeiras horas da cultura, principalmente na técnica de gota suspensa, Matrigel e HydroMatrix, podem estar associados ao período de esferoidização, em que as células ainda estão passando por reorganização estrutural nos agregados. A estabilidade estrutural dos agregados, formando esferoides mais rígidos e compactos, só ocorre a partir da secreção da MEC pelas células que se depositam nas camadas externas do esferoide e contribui para a geração de uma estrutura arredondada (SART *et al*., 2014). Idealmente, esperava-se uniformidade quanto aos valores de arredondamento dos esferoides gerados, e que esses valores fossem superiores a 0,90 (RAGHAVAN *et al*., 2015). De maneira geral, nos cultivos em ULA e HD, não houve formação de esferoides RT4 com arredondamento maior que 0,90, no entanto, em todos os números de células testados, esses valores foram maiores que 0,80, o que estaria próximo do

ideal. Quanto aos cultivos em Matrigel e HydroMatrix, o uso de hidrogel possibilitou a formação de esferoides RT4 com arredondamento maior que 0,90, no entanto, sem uma predominância absoluta. Na maioria das vezes, as culturas oscilaram entre esferoides com arredondamento ou entre 0,70 e 0,90 ou maiores que 0,90, evidenciando a falta de uniformidade desse parâmetro nos esferoides gerados.

Todos os esferoides RT4 gerados nas microplacas ULA e HD podem ser considerados regulares, independentemente do número inicial de células/poço, após a fase de esferoidização. Houve também predominância de esferoides RT4 regulares (solidez maior que 0,90) em ambas as culturas em hidrogel, na maioria das condições. Quanto à geometria, por apresentarem valores de IE iguais ou próximos a 0,90, os esferoides RT4 dos cultivos em ULA e HD podem ser classificados como apresentando forma que varia entre elipsóidica e totalmente esférica. Quanto aos esferoides RT4 gerados nos cultivos utilizando hidrogéis, a frequência de esferoides com geometria mais “perfeitamente esférica” predomina em grande parte do tempo nos cultivos em Matrigel, independentemente do número inicial de células. Nos cultivos em HydroMatrix, na maioria das condições, tem-se esferoides RT4 variando entre uma geometria elipsoidal e esférica, como de fato foi observado nas microscopias de campo claro (Figura 14).

5.1.3.3 Crescimento celular e viabilidade

Após caracterização do tamanho e forma dos esferoides RT4 gerados, avaliou-se a influência da organização 3D no crescimento das células RT4, comparando os resultados com o cultivo tradicional em monocamada (2D). Para os cultivos esferoides RT4 em ULA e HD, foram utilizados o método de contagem direta em câmara de Neubauer e quantificação da viabilidade por exclusão com Azul de Tripan, realizados ao longo de 168 horas de cultivo. Já a presença de células apoptóticas nessas culturas foi determinada por citometria de fluxo utilizando Anexina V-FITC como marcador de apoptose, nos tempos de cultivo de 120 e 168 horas. Culturas 2D também foram submetidas a esses ensaios para análise comparativa.

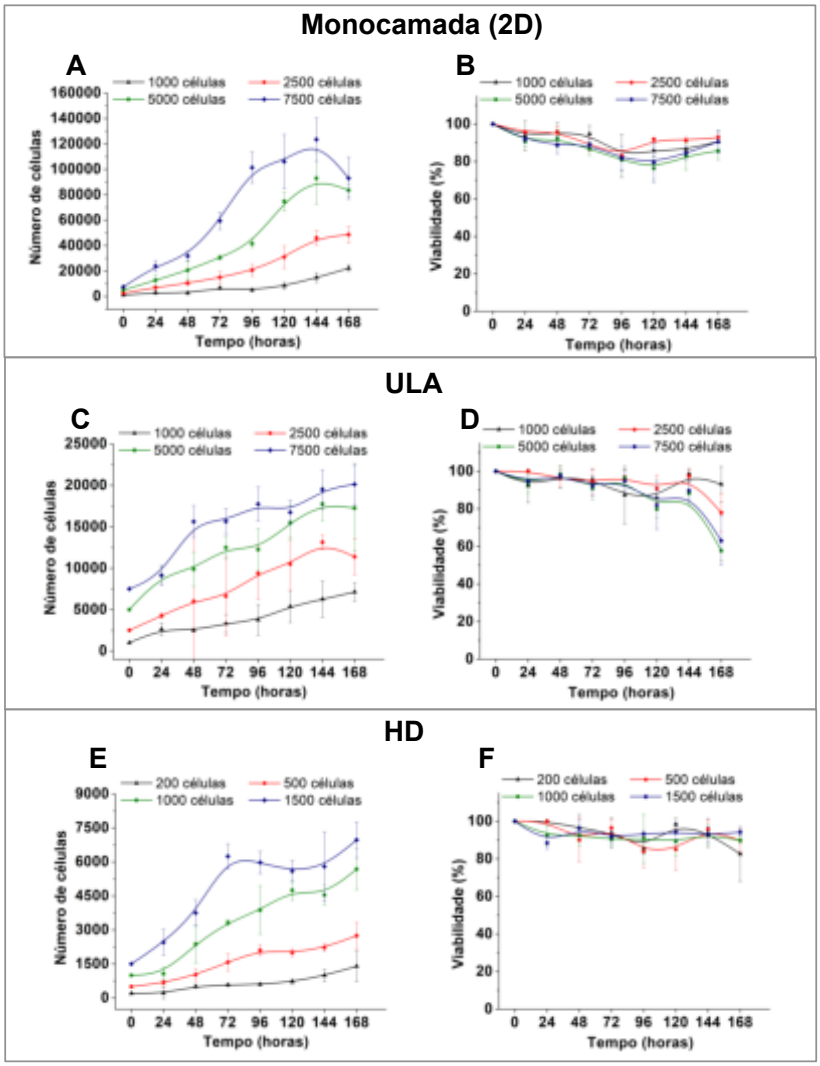
Devido às dificuldades no processo de recuperação dos esferoides RT4 das redes polimerizadas dos hidrogéis, com risco de dano aos esferoides, o crescimento celular e a atividade apoptótica desses cultivos foram determinados de forma

indireta por meio de ensaios de luminescência. Para o crescimento celular, foi utilizado o ensaio 3D Cell Titer-Glo® (Promega), que envolve a geração de Unidades Relativas de Luminescência (URL) após a oxidação da luciferina pela luciferase ativa. Como a reação só acontece na presença de ATP, os URL produzidos serão proporcionais às moléculas de ATP presentes na cultura, que, por sua vez, serão proporcionais ao número de células. Por meio das variações nos valores de URL obtidos em cada condição ao longo do tempo, é possível construir a curva de crescimento e calcular os fatores de expansão dos cultivos. O ensaio utilizando o *kit* Caspase-Glo®3/7 (Promega) funciona de forma semelhante, no entanto, a ativação da luciferase, e geração de URL, dá-se pela presença da Caspase 3/7 ativa presente nas culturas. Células em apoptose possuem alta expressão de Caspase 3/7 ativa, portanto, as URL produzidas serão proporcionais à atividade das Caspases 3/7, que, por sua vez, serão proporcionais ao número de células apoptóticas presentes na cultura. As culturas em condições 2D foram submetidas também a ambos os métodos para análise comparativa.

Quando cultivadas em monocamada, as células costumam apresentar um perfil típico de crescimento celular dividido em quatro fases: (1) latência, ou *lag*, é a fase de adaptação das células às condições de cultivo que ocorre logo após o plaqueamento e é caracterizada por uma singela taxa de duplicação celular; (2) exponencial, ou *log*, é caracterizada pela aceleração da taxa de duplicação das células e aumento do número total de células em escala logarítmica; (3) estacionária, em que ocorre uma diminuição na taxa de crescimento das células devido à limitação de algum requisito para a divisão celular ou acúmulo de metabólitos em concentrações tóxicas; (4) declínio, quando a taxa de morte se torna progressivamente superior à de duplicação, e o número total de células decresce (FRESHNEY, 2011).

As fases de crescimento puderam ser observadas nos cultivos em monocamada das células RT4 em todas as condições (Figura 20A).

Figura 20. Crescimento e viabilidade das células RT4 nos cultivos em monocamada, ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo



(A, B): crescimento e viabilidade celular, respectivamente, da linhagem RT4 nos cultivos em monocamada com números iniciais de 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço. (C, D): crescimento e viabilidade celular, respectivamente, dos esferoides RT4 nos cultivos em ULA com números iniciais de 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço. (E, F): crescimento e viabilidade celular, respectivamente, dos esferoides RT4 nos cultivos em HD com números iniciais de 200, 500, 1.000 e 1.500 células/poço. Número de células calculado por meio de contagem em câmara de Neubauer. Viabilidade calculada por meio do método de exclusão por Azul de Tripan. Dados apresentados como a média do número de células ou viabilidade ± desvio-padrão (n=4).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

Nas culturas iniciadas com 1.000 e 2.500 células/poço, as fases de latência foram extensas, e a fase exponencial teve início somente em 72 e 96 horas, respectivamente. Como discutido anteriormente, essas células possuem a característica de se organizarem no tecido nativo de maneira justaposta, o que significa que o contato entre as células é importante para o seu crescimento. Os valores baixos de número inicial de células utilizado, como 1.000 e 2.500

células/poço, promoveram maior distanciamento entre as células no início da cultura, o que levou a uma taxa de crescimento menor e maior tempo para alcançar a fase exponencial. Observou-se um platô após a fase exponencial nas culturas iniciadas com 2.500 células/poço (144 horas); no entanto, em ambas as culturas, 1.000 e 2.500 células/poço, não foi observada a fase de declínio até o final do experimento. As culturas iniciadas com 1.000 células atingiram um número máximo de 22.188 ± 2.610 células totais e apresentaram um fator de expansão de 22,37 vezes. Já para as culturas iniciadas com 2.500 células, o número máximo foi de 48.600 ± 6.444 células, e o fator de expansão foi de 20,86 vezes.

Praticamente não foi observada a fase *lag* nos cultivos iniciados com 5.000 e 7.500 células/poço. As culturas atingiram os valores máximos de células totais em 144 horas de cultivo, com uma média de 83.500 ± 5.050 células para as culturas iniciadas com 5.000 células/poço (fator de expansão de 19,33 vezes) e uma média de 92.968 ± 16.548 células (fator de expansão de 16,46 vezes) para as culturas iniciadas com 7.500 células células/poço. A partir desse período, o número de células decresceu em ambas as condições. Frequentemente, esse declínio pode estar associado tanto à escassez de nutrientes e produção de metabólitos em concentrações tóxicas pelas células, quanto à limitação de espaço disponível no poço. Com base nas microscopias da Figura 6 (seção 5.1.1), devido à existência de espaços ainda disponíveis para a expansão dessas células ao fim de 168 horas de experimento, a diminuição no número de células possivelmente estava associada à primeira causa mencionada. O metabolismo das células RT4 nos diferentes cultivos também foi avaliado, sendo apresentado adiante (seção 5.2.4). Quanto à viabilidade celular, as culturas iniciadas com 1.000 e 2.500 células apresentaram valores médios acima de 93% no início do cultivo (Figura 20B). Esses valores decresceram a partir de 72 e 48 horas, respectivamente, mas permaneceram acima dos 83% até o fim dos experimentos. As culturas com 5.000 e 7.500 células/poço iniciaram os cultivos com viabilidade média de 90% em 24 horas, caindo para valores um pouco abaixo de 80% no decorrer do cultivo.

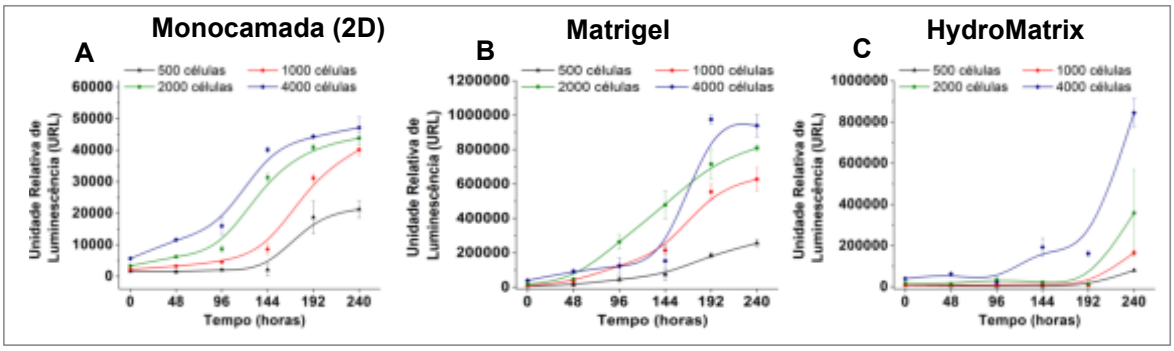
A delimitação exata das fases de crescimento em ambos os cultivos 3D livres de suportes foi mais dificultosa. As células RT4 cultivadas nas microplacas ULA e HD apresentaram um perfil de crescimento distinto das culturas 2D, sem uma fase de latência evidente. Nas microplacas ULA, as culturas iniciadas com 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células/poço atingiram em média um número máximo de células de

7.126 ± 1.108; 13.125 ± 854; 17.750 ± 2.020 e 20.126 ± 2.500 células totais, apresentando um fator de expansão de 7,25; 5,5; 3,8 e 2,8 vezes, respectivamente (Figura 20C). A viabilidade média das culturas iniciadas com 1.000 células/poço manteve-se acima de 90% durante a maior parte do experimento (Figura 20D). As culturas iniciadas com 2.500 células/poço apresentaram viabilidade média acima de 90% até 144 horas de cultivo, quando esta decresceu para 77,90 ± 9,95%. Já nas culturas iniciadas com 5.000 e 7.500 células, a viabilidade média permaneceu superior a 90% somente nas primeiras 96 horas de cultivo. A partir desse tempo, houve uma queda na viabilidade dessas culturas, que chegou a valores próximos a 60% ao final de 240 horas de experimento.

Os esferoides RT4 cultivados nas microplacas HD atingiram em média um número total de células de 1.400 ± 668,40; 2.750 ± 591,6; 5.685,2 ± 914 e 6.972 ± 784 ao final dos experimentos nas culturas iniciadas com 200, 500, 1.000 e 1.500 células/poço (Figura 20E), apresentando fatores de expansão médios de 7,63 ± 2,66, 5,5 ± 1,18, 5,76 ± 0,981 e 4,65 ± 0,51 vezes, respectivamente. De forma geral, todas as condições mantiveram viabilidade média acima de 90% durante todo o experimento, com pequenas oscilações em algumas condições (Figura 20F). Como previsto, o número total de células nas condições analisadas nas culturas HD foi menor do que nas culturas em ULA devido ao menor número inicial de células. No entanto, ao compararmos os fatores de expansão obtidos, não houve diferença estatística quanto ao crescimento entre as culturas ULA e HD. Essa diferença, por sua vez, foi observada entre as culturas 3D livres de suportes e as culturas 2D (ANOVA de uma via com teste *post hoc* Tukey HSD, $p<0,05$).

As curvas de crescimento das células RT4 nos esferoides gerados em Matrigel e HydroMatrix e das culturas em monocamada submetidas ao método de análise por luminescência encontram-se apresentadas na Figura 16B. Houve crescimento em todas as condições de cultivo em monocamada, evidenciado pelo aumento dos valores de URL, que foram maiores nos cultivos iniciados com 4.000 células/poço (Figura 21A). Não foi observada a fase declínio até as 240 horas de cultivo nas condição analisadas. Os valores de fator de expansão dessas culturas foram de 13,09; 18,26; 13,09 e 8,25 vezes para os cultivos iniciados com 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço, respectivamente. Possíveis diferenças quanto ao comportamento de crescimento das culturas 2D mensurado pelos métodos direto e indireto são inerentes às diferentes técnicas empregadas e tempos de cultivo.

Figura 21. Crescimento e viabilidade das células RT4 nos cultivos em monocamada, Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo



Unidades relativas de luminescência (URL) proporcionais ao número de células RT4 viáveis nos cultivos. (A): crescimento celular da linhagem RT4 nos cultivos em monocamada. (B): crescimento celular dos esferoides RT4 nos cultivos em Matrigel. (C): crescimento celular dos esferoides RT4 nos cultivos em HydroMatrix. Quantidade de células viáveis determinadas indiretamente pela geração de URL em ensaios de luminescência. Dados apresentados como a média de URL ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: autoria própria.

Nos cultivos em Matrigel, os valores de fator de expansão foram de 37,90; 77,66; 44,89 e 24,44 vezes nas culturas iniciadas com 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço (Figura 21B). As culturas em Matrigel apresentaram valores de fator de expansão maiores do que as culturas 2D nos inóculos de 500, 1.000 e 2.000 células/poço. Já nos cultivos em HydroMatrix, o aumento no número de células ocorreu somente após 192 horas de cultivo para as culturas iniciadas com 500, 1.000 e 2.000 células/poço, representando um fator de expansão de 11,73; 20,41 e 21,52, respectivamente (Figura 21C). Os cultivos iniciados com 4.000 células/poço apresentaram crescimento expressivo já em 96 horas de cultivo, com fator de expansão de 21,18. Os valores de fator de expansão das culturas iniciadas com 500 e 1.000 células/poço foram menores que os fatores reportados para as culturas 2D. Por sua vez, os valores de fator de expansão obtidos para as culturas iniciadas com 2.000 e 4.000 células/poço (21,64 e 22,32 vezes, respectivamente) foram semelhantes aos obtidos para as culturas 2D.

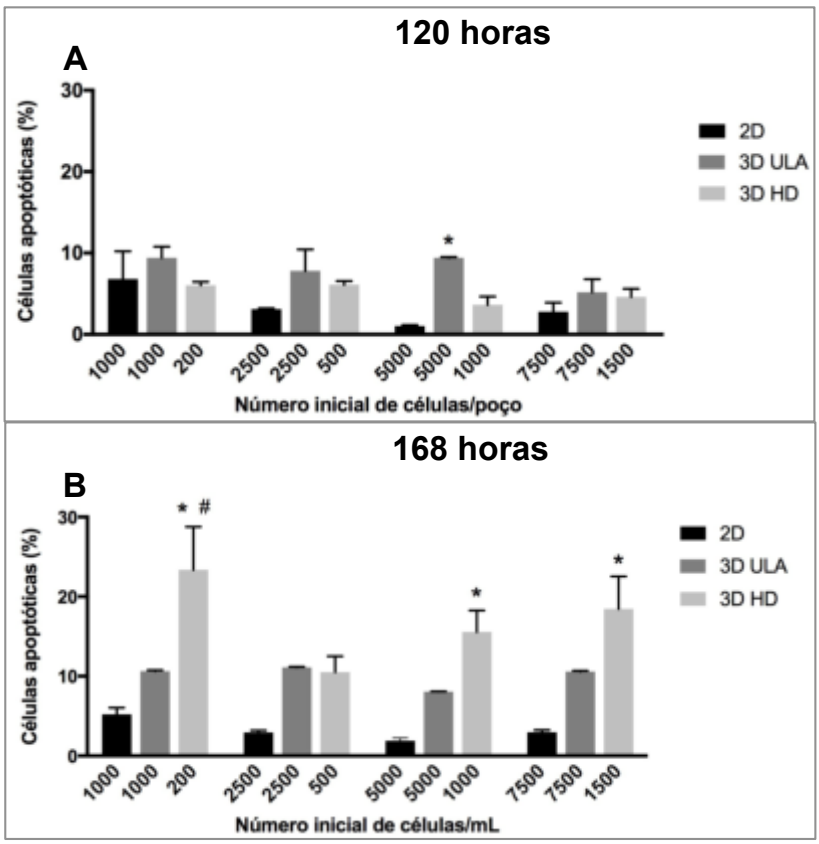
Diferenças nos perfis de crescimento observadas entre as culturas 3D livres de suporte (ULA e HD) e 2D já foram relatadas em outras linhagens celulares (CHITCHOLTAN; SYKES; EVANS, 2012; LUCA *et al*., 2013; MARIA *et al*., 2011). Todas as células em culturas 2D recebem a mesma quantidade de nutrientes e fatores de crescimento do meio, uma vez que se ligam a uma superfície plana, formando uma monocamada (HUANG *et al*., 2013). Durante a troca do meio de cultura, a maioria das células necróticas é removida e, portanto, as células em

proliferação são predominantes em culturas 2D (EDMONDSON *et al*., 2014). Por outro lado, os esferoides 3D consistem em células em diferentes estágios, com células viáveis e em proliferação, possivelmente mais concentradas apenas nas camadas externas. Essa característica resulta em dinâmica de crescimento celular com proliferação inicial seguida de crescimento lento, o que é comumente observado em tumores *in vivo* (SUTHERLAND, 1988; FRANCIA *et al*., 2005; TRÉDAN *et al*., 2007; SHIELD *et al*., 2009; HIRSCHHAEUSER *et al*., 2010). Portanto, quando cultivadas como esferoides nas microplacas ULA e HD, as células RT4 parecem ser capazes de reproduzir essas características de crescimento observadas nas células tumorais da bexiga *in vivo.*

No entanto, nos esferoides RT4 das culturas em Matrigel, as células apresentaram um maior crescimento celular não só em relação aos outros cultivos 3D, como também em relação às culturas 2D. Esse comportamento pode estar associado ao tamanho desses esferoides. As culturas em Matrigel foram as que geraram os menores esferoides RT4. Esferoides pequenos podem conter um maior número de células proliferativas espalhadas por todas as camadas do esferoide (RIFFLE *et al*., 2017), uma vez que a difusão de nutrientes e gases não se limita às camadas mais externas. Soma-se a isso o fato de os hidrogéis mimetizarem algumas características físicas da MEC, como porosidade e resistência mecânica (DÁVILA, 2014), que podem exercer forte influência no comportamento de proliferação das células (GRAVEL *et al*., 2006; BADROSSAMAY *et al*., 2014; WU *et al*., 2014). Com relação às culturas em hidrogéis naturais, como o Matrigel, de maneira geral as células apresentam alta viabilidade celular e proliferação, diferenciação controlada e fenótipo celular semelhante ao observado *in vivo* (ORGEL; PERSIKOV; ANTIPOVA, 2014). Além disso, o Matrigel é o hidrogel que melhor recapitula as condições bioquímicas da MEC, uma vez que possui proteínas de matriz extracelular, como os fatores de crescimento, que podem ter impulsionado a proliferação celular das células RT4 (HUGHES; POSTOVIT; LAJOIE, 2010; WONG, 2011).

Os resultados referentes aos níveis de apoptose das culturas em monocamada e 3D livres de suporte foram apresentados na Figura 22.

Figura 22. Apoptose nos cultivos em monocamada, ULA e HD das células RT4 em 120 e 168 horas de cultivo

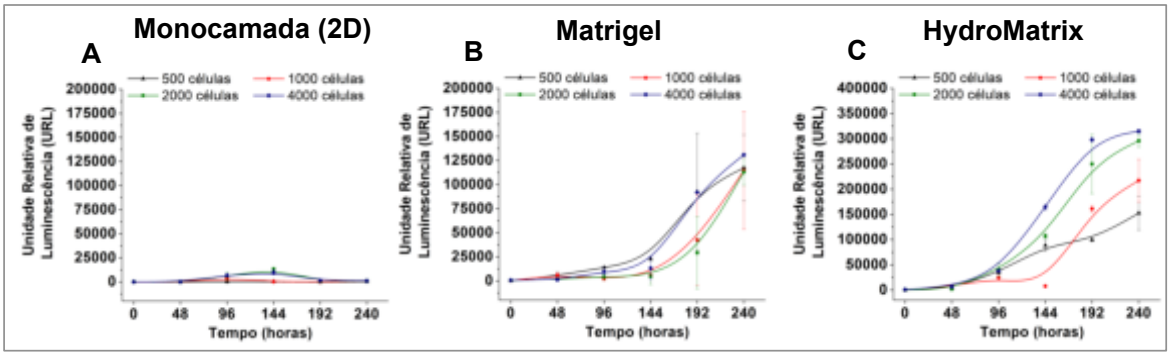


(A): após 120 horas de cultivo. (B): após 168 horas de cultivo. Células marcadas com Anexina V-FITC e analisadas por citometria de fluxo. Teste estatístico ANOVA de uma via com teste *post hoc* Tukey HSD ($p<0,05$.). Diferença em relação ao 2D (*). Diferença em relação à cultura ULA (#). Dados apresentados como a média de frequência ± desvio-padrão (n=4).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

Apesar de os números iniciais em células/poço serem diferentes entre os cultivos HD e os demais, os valores de densidade inicial de células foram os mesmos para os três cultivos (5; 12,5; 25, 37,5x10^3 células/poço). Em 120 horas de cultivo, houve diferença estatística na porcentagem de células apoptóticas apenas entre as culturas 2D e 3D em ULA iniciadas com 5.000 células/poço (Figura 22A). No caso das culturas de 168 horas, observamos um número significativamente maior de células apoptóticas em culturas HD iniciadas com 200, 1.000 e 1.500 células/poço quando comparadas às culturas 2D. Entre as culturas 3D, somente foi observada diferença estatística no tempo de 168 horas nos cultivos com menor número inicial de células (*One-way* ANOVA de uma via com teste *post hoc* Tukey HSD, $p<0,05$).

A atividade apoptótica nos cultivos dependentes de suporte foi apresentada na Figura 23.

Figura 23. Apoptose nos cultivos em monocamada, Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo



Unidades relativas de luminescência (URL) proporcionais ao número de células RT4 apoptóticas nos cultivos. (A): quantidade de células apoptóticas RT4 nos cultivos em monocamada. (B): quantidade de células apoptóticas RT4 nos cultivos em Matrigel. (C): quantidade de células apoptóticas RT4 nos cultivos em HydroMatrix. Quantidade de células apoptóticas determinada indiretamente pela geração de URL em ensaios de luminescência. Dados apresentados como a média de URL ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: autoria própria.

Nos cultivos em Matrigel, após 144 horas de cultivo, todas as culturas começaram a apresentar valores de URL maiores que 20.000. Ao final do experimento, as atividades das Caspases 3/7 atingem valores entre 112.500 e 125.000 URL em todas as condições de cultivo em Matrigel. De acordo com dados presentes no protocolo do ensaio fornecido pelo fabricante e dados da literatura (RISS *et al*., 2013), há detecção significativa de atividade das Caspases 3/7 se os valores de URL ultrapassarem 20.000 URL. Já as culturas em HydroMatrix começaram a apresentar atividade de Caspase 3/7 logo após as primeiras 96 horas de cultivo nas condições de 500, 2.000 e 4.000 células/poço iniciais. As atividades das Caspases ao final do experimento também são maiores que as observadas em Matrigel, chegando a valores que variaram entre 150.000 e 300.000. Para as culturas em monocamada, não foram observados valores de URL maiores que 20.000, portanto, não foi detectada atividade das Caspases 3/7.

A apoptose é um fenômeno de alta complexidade celular, influenciado por uma ampla variedade de fatores. Uma das principais propriedades de algumas células tumorais é a capacidade de desenvolver mecanismos antiapoptóticos (WONG, 2011). Essa propriedade está relacionada tanto à tumorigênese de alguns cânceres quanto à sua resistência a fármacos que induzam morte celular por apoptose (KIM *et al*., 2007). Por isso, é alvo de muitos estudos que buscam desenvolver fármacos antineoplásicos que atuem em alguma das vias de apoptose das células tumorais

(KIM; EMI; TANABE, 2006). Em cultura de células, a indução de apoptose pode ocorrer devido à escassez de nutrientes ou à produção de metabólitos em concentrações tóxicas após longos períodos de tempo. No entanto, nos cultivos 2D das células RT4, ou a atividade apoptótica foi inexistente, ou a porcentagem de células apoptóticas permaneceu abaixo dos 10% até o final de 168 horas de cultivo. Os perfis metabólicos das culturas RT4 foram analisados neste trabalho e apresentados na seção 5.1.3.4.

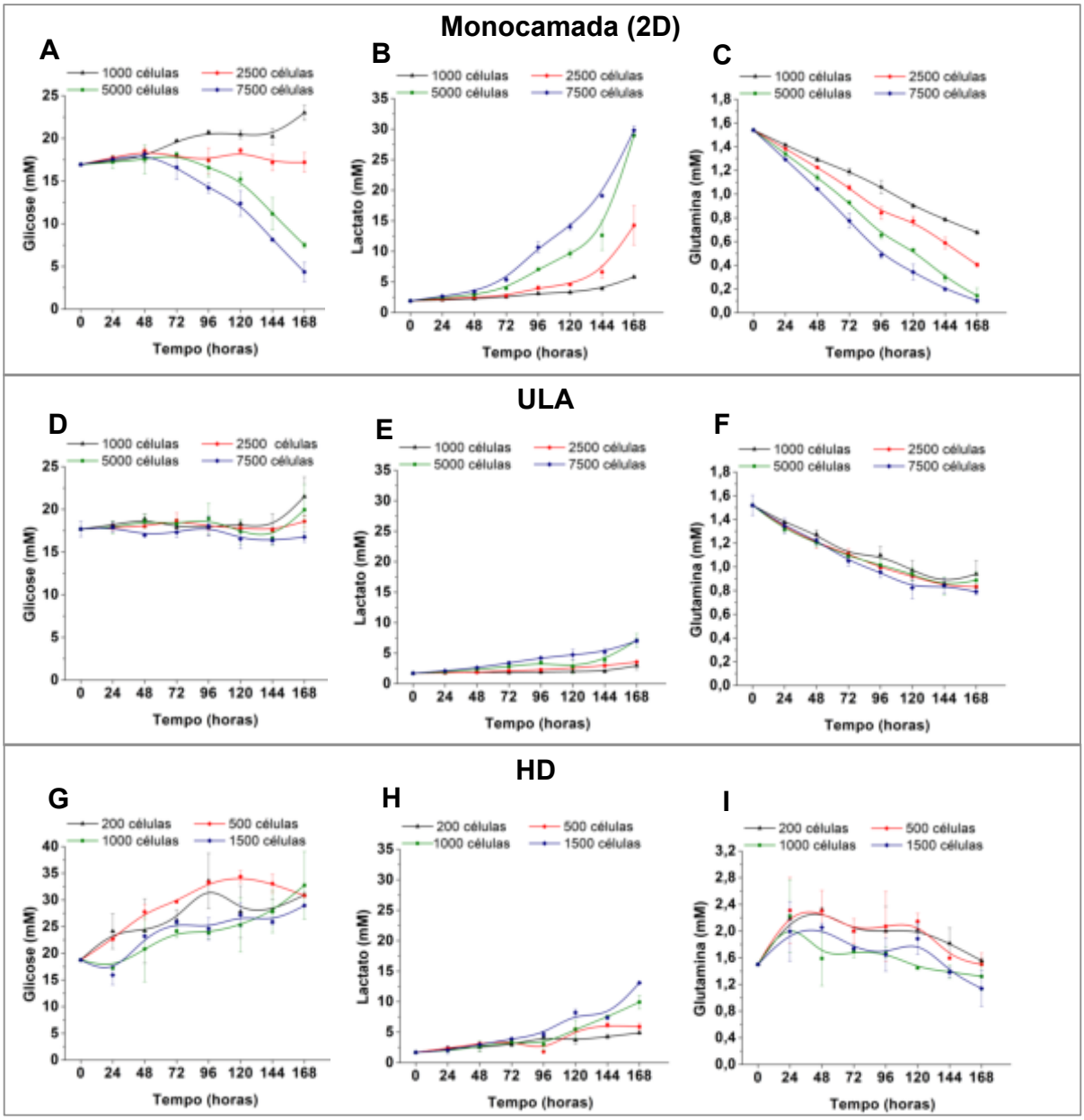
A apoptose foi identificada nos cultivos em HD, Matrigel e HydroMatrix. O aumento no número de células apoptóticas ao longo desses cultivos poderia ser justificado pelo início da formação de um núcleo hipóxico nesses esferoides, que, como consequência, aumenta a subpopulação de células que estão entrando em apoptose (FRIEDRICH *et al*., 2009). De fato, o aumento no número de células apoptóticas em esferoides tem sido relacionado a um aumento do tamanho desses e ao aumento do núcleo hipóxico, em trabalhos utilizando células mesenquimais e de glioma (KHAITAN *et al*., 2006; MURPHY *et al*., 2017). Diferentemente dos tumores sólidos *in vivo*, os cultivos 3D *in vitro* não desenvolvem um sistema de vascularização que leve gases e nutrientes ao interior das células (HIRSCHHAEUSER *et al*., 2010; GONG *et al*., 2015; STOCK *et al*., 2016). No entanto, essas evidências não explicam a ocorrência da atividade apoptótica nos cultivos 3D gerados neste trabalho, uma vez que esferoides com tamanhos menores que 200 µm de diâmetro, como os gerados nas culturas em Matrigel e HydroMatrix, não seriam capazes de desenvolver tal núcleo hipóxico (LARUE; KHALIL; FREYER, 2004; HARDELAUF *et al*., 2011; PATRA *et al*., 2013). Além disso, neste trabalho os esferoides de maior tamanho foram gerados em ULA e não apresentaram ocorrência de células apoptóticas.

5.1.3.4 Metabolismo celular

Alterações no metabolismo podem ser observadas com frequência em células tumorais quando comparadas às células saudáveis. O consumo de nutrientes bem como a produção de metabólitos vão depender do tipo de células cancerígenas, grau de invasão e condições de cultura (CONDE *et al*., 2015). Por essa razão, a atividade metabólica das células RT4 nas diferentes culturas 3D também foi caracterizada neste trabalho por meio do perfil de consumo de glicose e glutamina e

produção de lactato. Os resultados foram comparados com os obtidos em condições de cultivo 2D (Figura 24).

Figura 24. Perfil metabólico das células RT4 nos cultivos em monocamada, ULA e HD ao longo de 168 horas de cultivo



(A – C): concentração de glicose, lactato e glutamina, respectivamente, no meio de cultura dos cultivos das células RT4 em monocamada. (D – F): concentração de glicose, lactato e glutamina, respectivamente, no meio de cultura dos cultivos de esferoides RT4 em ULA. (G – I): concentração de glicose, lactato e glutamina, respectivamente, no meio de cultura dos cultivos de esferoides RT4 em HD. As concentrações dos nutrientes e metabólitos foram analisadas pelo analisador bioquímico automático 2700 YSI. Dados apresentados como a média das concentrações ± desvio-padrão (n=4). Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2017).

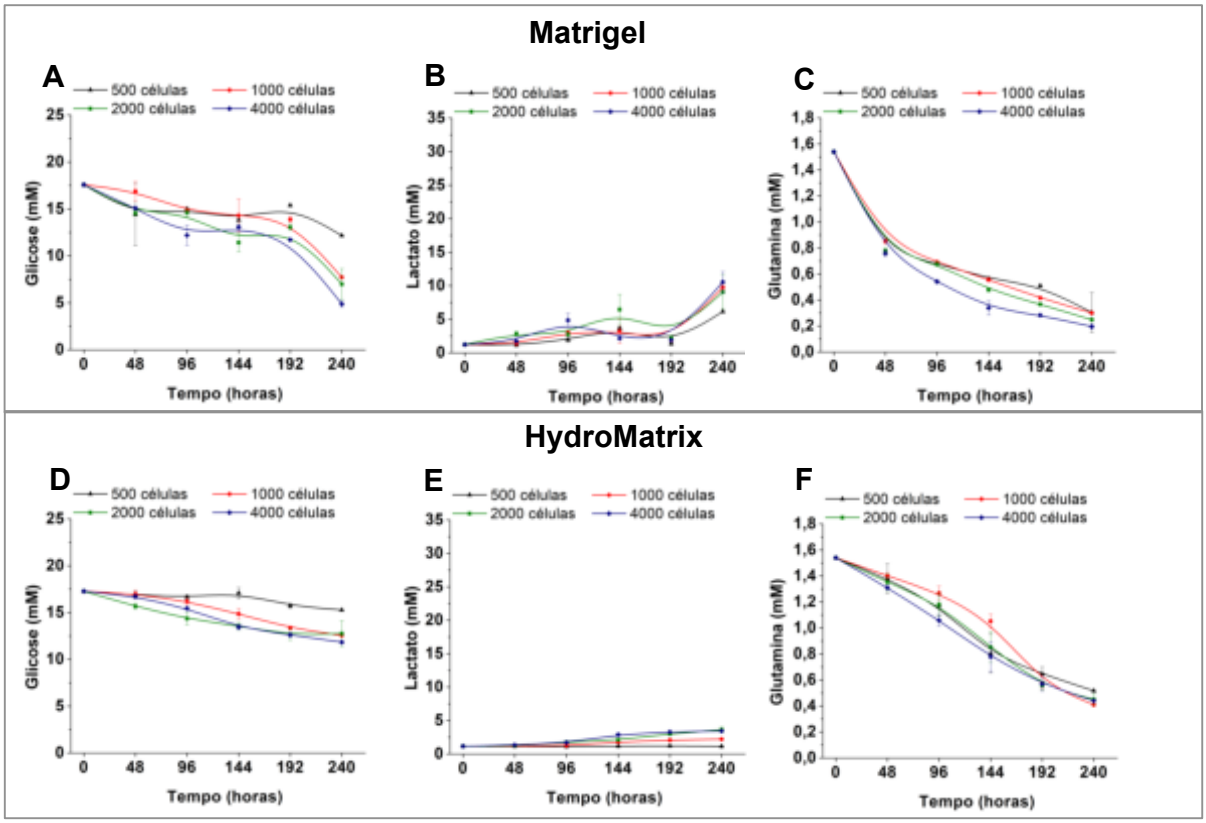
Em monocamada, o consumo de glicose pelas células RT4 foi observado apenas em culturas iniciadas com 5.000 e 7.500 células/poço, onde a concentração

de glicose diminui de 17 ± 0,16 mM para 7,5 ± 0,32 e 4,35 ± 1,1 mM, respectivamente (Figura 24A). Como o lactato é um subproduto do metabolismo da glicose, a concentração de lactato atingiu o nível mais alto, cerca de 30 mM, nas culturas com maior consumo de glicose (Figura 24B). Foi observada uma diminuição nas concentrações de glutamina no meio, independentemente do número inicial de células (Figura 24C). Os níveis de glutamina diminuíram de 1,54 ± 0,01 mM para 0,68 ± 0,02; 0,40 ± 0,02; 0,14 ± 0,06 e 0,10 ± 0,01 mM nas culturas iniciadas com 1.000, 2.500, 5.000 e 7.500 células, respectivamente.

Nas culturas 3D ULA e HD, o consumo de glicose foi praticamente inexistente (Figura 24D e G). Como consequência, a produção do subproduto lactato também foi baixa (Figura 24E e H). O aumento na concentração de glicose, bem como de lactato, observado nas culturas HD muito provavelmente foi decorrente da evaporação do meio de cultura, uma limitação técnica dessa abordagem já discutida anteriormente. A fonte energética principal dessas culturas foi a glutamina (Figura 24I), assim como observado nas culturas 2D. No entanto, de maneira geral, as culturas ULA e HD apresentaram uma taxa de consumo de glutamina inferior à observada nas culturas 2D.

Nos cultivos em Matrigel e HydroMatrix, houve também consumo preferencial de glutamina em relação à glicose (Figura 25). As culturas em Matrigel foram as que mais consumiram glutamina, chegando a valores de 0,30 ± 0,15; 0,30 ± 0,0; 0,25 ± 0,0 e 0,19 ± 0,01 mM nas culturas iniciadas com 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço, respectivamente (Figura 25C), aproximando-se de um perfil de consumo similar ao das culturas em monocamada. Os esferoides RT4 em Matrigel passaram também a consumir glicose como segunda fonte energética, principalmente após 192 horas de cultivo, quando a concentração de glicose no meio decresceu para 12,16 ± 0,0; 7,72 ± 0,07; 7,0 ± 1,64 e 4,87 ± 0,31 mM nas culturas iniciadas com 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço, respectivamente (Figura 25A). O aumento na concentração de lactato nas culturas em Matrigel iniciadas com 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço foi em consequência desse consumo de glicose observado a partir de 192 horas (Figura 25B).

Figura 25. Perfil metabólico das células RT4 nos cultivos em Matrigel e HydroMatrix ao longo de 240 horas de cultivo



(A – C): concentração de glicose, lactato e glutamina, respectivamente, no meio de cultura dos cultivos de esferoides RT4 em Matrigel. (D – F): concentração de glicose, lactato e glutamina, respectivamente, no meio de cultura dos cultivos de esferoides RT4 em HydroMatrix. As concentrações dos nutrientes e metabólitos foram analisadas pelo analisador bioquímico automático 2700 YSI. Dados apresentados como a média das concentrações ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: autoria própria.

Nas culturas em HydroMatrix, também houve consumo de glicose. As concentrações de glicose no meio variaram de 17,27 mM a 15,27 ± 0,2; 12,55 ± 0,07; 12,75 ± 1,37 e 11,83 ± 0,15 mM para as culturas iniciadas com 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço (Figura 25D). Consequentemente, a produção de lactato também foi baixa, atingindo o valor máximo de 3,62 ± 0,41 mM (Figura 25E). Novamente, a glutamina foi o nutriente mais consumido, variando as concentrações no meio de cultura de 1,54 mM a 0,51 ± 0,05; 0,41 ± 0,01; 0,45 ± 0,04 e 0,44 ± 0,05 mM para as culturas iniciadas com 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço (Figura 25F).

A alteração das vias metabólicas tem sido considerada uma das características do câncer. As células que compõem os tumores sólidos costumam apresentar uma capacidade aumentada de consumo de glicose, quando comparadas às células normais. Diferentemente das células normais, que produzem energia principalmente

por fosforilação oxidativa, as células tumorais produzem energia por meio de glicólise aeróbica, em que o ácido pirúvico é transformado em lactato mesmo na presença de oxigênio, fenômeno conhecido como Efeito Warburg (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). O resultado energético dessa via é baixo quando comparado ao da fosforilação oxidativa. Para compensar essa produção energética e manter as altas taxas proliferativas, as células tumorais costumam superexpressar transportadores de glicose (aumenta influxo) e enzimas glicolíticas (PHAN, YEUNG; LEE, 2014). Alguns oncogenes, como *RAS, MYC* e *HIF-1 α*, estão relacionados com a ativação direta ou indireta de genes glicolíticos nas células tumorais (MARBANIANG & KMA, 2018). Se o efeito Warburg é causa ou consequência do desenvolvimento tumoral, ainda permanece incerto (LIBERTI & LOCASALE, 2016), mas estudos recentes mostram que essa preferência por uma via não oxidativa de consumo de glicose e consequente produção de lactato pode ser decorrente da formação da região de hipóxia no núcleo desses tumores sólidos (FADAKA *et al*., 2017).

Nos resultados obtidos neste trabalho, as células RT4, independentemente da tecnologia de cultivo, mostraram preferência pelo consumo de glutamina em vez de glicose. Em monocamada, o consumo de glicose foi observado apenas nas culturas com maior número de células iniciais (5.000 e 7.500 células/poço), que apresentaram também alta atividade proliferativa. O consumo de glicose também foi observado nos esferoides RT4 cultivados em Matrigel e HydroMatrix, que foram os cultivos 3D que apresentaram os maiores resultados de crescimento celular (seção 5.1.3.3). As culturas em Matrigel apresentaram maiores valores tanto de consumo de glicose quanto de fator de expansão celular. O consumo de glicose nesses casos pode estar associado a um alto requerimento energético devido às maiores taxas de proliferação celular.

De acordo com Lea, Altayyar e Desbordes (2015), as células RT4 crescem na dependência de glutamina, diferentemente de outras linhas celulares de câncer de bexiga, em que a glicose é de fato a principal fonte de energia (LEA; ALTAYYAR; DESBORDES, 2015), justificando, portanto, a preferência pelo consumo de glutamina em relação à glicose, em todas as condições de cultivo. Muitas outras células tumorais possuem uma alta dependência de glutamina para seu crescimento e sobrevivência, como as células não pequenas de câncer de pulmão, câncer de mama e de cérebro (MOHAMED *et al*., 2014; MARQUEZ *et al*., 2017). O

metabolismo da glutamina nesses tumores pode estar associado a diversos mecanismos, dentre eles, as vias de transdução de sinal e sobrevivência da células em um microambiente de estresse metabólico e oxidativo (CHOI & PARK, 2018). Novamente, oncogenes como *MYC* e *HIF-1 α* são descritos na literatura por também participarem na ativação de enzimas envolvidas no metabolismo da glutamina.

Mesmo demonstrando preferência pelo consumo de glutamina, os esferoides RT4 nos cultivos em ULA, HD e HydroMatrix mostraram menor taxa de consumo quando comparadas ao 2D. A redução na atividade metabólica dos esferoides é relatada na literatura (DESOIZE & JARDILLIER, 2000) e pode estar relacionada com a regulação negativa da expressão de enzimas metabólicas envolvidas na quebra e transporte dos nutrientes. Essa regulação diferencial foi observada tanto em tumores sólidos *in vivo* quanto em esferoides (WERNER & WERB, 2002) e pode estar relacionada a um mecanismo de resistência dessas células a eventuais alterações nutricionais no microambiente (ZAHIR & WEAVER, 2004). Já os esferoides RT4 em Matrigel apresentaram um perfil de consumo de glutamina semelhante aos cultivos 2D, o que pode estar associado, novamente, aos maiores valores de fator de expansão.

5.1.4 Seleção das técnicas de cultivo 3D

Os principais resultados obtidos na geração e caracterização das culturas 3D com células de tumor de bexiga RT4 foram apresentados na Tabela 7 de maneira comparativa. Ambas as técnicas de cultivo livre de suportes, microplacas ULA e HD, geraram um único esferoide por poço, com tempo de esferoidização de 48 horas. Os esferoides RT4 apresentaram tamanho superior a 300 μm de diâmetro, valor mínimo preconizado pela literatura para que algumas das características dos tumores sólidos possam ser recapituladas *in vitro.* Houve aumento no tamanho ao longo do cultivo, no entanto, a razão entre o valor final e o inicial foi da ordem de 1,20 em ambas as técnicas (variação considerada baixa). Quanto aos parâmetros de forma, foram classificados como possuindo uma geometria que variou entre elipsoidal e esférica, já que os valores de IE não foram superiores a 0,90, mas se mantiveram próximos a esse valor por quase todo o cultivo. Além disso, possuíam contornos arredondados e superfície regular. Em ambas as técnicas, houve reprodutibilidade

entre os poços de uma mesma condição quanto à geração de esferoides com as mesmas características de tamanho e forma.

Tabela 7 – Comparação dos principais resultados obtidos nas culturas 3D de células RT4 empregando diferentes técnicas de cultivo

	Cultivos 3D			
	ULA	**HD**	**Matrigel**	**HydroMatrix**
Tempo de “esferoidização”	48	48	96	96
Número de esferoides por poço	1	1	Vários	Vários
Aumento no tamanho do esferoide	Sim (variação baixa)	Sim (variação baixa)	Sim (variação intermediária)	Sim (variação alta)
Formação de esferoides maiores que 300 µm de diâmetro	Sim	Sim	Não	Não
Arredondamento (Ar)	0,80 < Ar < 0,90	0,80 < Ar < 0,90	Variável 0,7 < Ar < 0,90 ou Ar > 0,90	Variável 0,7 < Ar < 0,90 ou Ar > 0,90
Solidez	Regulares (>0,95)	Regulares (>0,95)	Regulares (>0,90)	Regulares (>0,90)
Índice de Esfericidade (IE)	Elipsoidal/Esférico (IE < ou ~ 0,90)	Elipsoidal/Esférico (IE < ou ~ 0,90)	Esférico (IE > 0,90)	Elipsoidal/Esférico (IE < 0,90 e IE > 0,90)
Reprodutibilidade dos esferoides gerados em uma mesma condição	Alta	Alta	Média	Baixa
Fator de expansão em comparação ao 2D	Menor	Menor	Maior	Menor
Presença de células apoptóticas em relação ao 2D	Não	Sim	Sim	Sim
Metabolismo em relação ao 2D	Reduzido	Reduzido	Igual	Reduzido
Plaqueamento	Fácil	Difícil	Intermediário	Difícil
Perda de volume por evaporação	Baixa	Alta	Baixa	Baixa
Manutenção da cultura	Fácil	Difícil	Fácil	Fácil
Monitoramento em tempo real	Fácil	Difícil	Intermediário	Intermediário
Troca de meio	Fácil	Difícil	Difícil	Difícil

Transferência de placa para realização de ensaios	Não	Sim	Não	Não

Os esferoides RT4 em ULA e HD também apresentaram crescimento celular, mas com fatores de expansão menores que os cultivos 2D. Consequentemente, o consumo de nutrientes também foi inferior ao cultivo 2D. No entanto, ambos os esferoides consumiram preferencialmente glutamina em detrimento à glicose. As técnicas se diferenciaram apenas quanto ao número de células apoptóticas presentes nos esferoides (cultivos HD com maior porcentagem em comparação aos cultivos em ULA e em monocamada). De modo geral, as duas diferentes técnicas utilizadas para a geração dos cultivos livres de suporte – flutuação forçada e gota suspensa –, não exerceram influência no processo de geração dos esferoides RT4 nem nas características que foram descritas. A análise comparativa levou em consideração não só os resultados quantificáveis, obtidos com a caracterização, mas também os aspectos técnicos de manipulação das culturas, uma vez que isso pode vir a limitar a aplicação dos esferoides em plataformas de HTS. O plaqueamento foi considerado difícil nas placas HD, uma vez que exigiu muita técnica e treino para o estabelecimento das gotas. O difícil manuseio e monitoramento das microplacas HD durante o cultivo foi outra limitação observada. Qualquer perturbação mecânica na incubadora, resultando em suaves vibrações das prateleiras, danificava a formação dos esferoides ou causava a queda das gotas. Além disso, o baixo volume de trabalho dificultou as trocas de meio e resultou na rápida evaporação do meio de cultura nessas microplacas, o que dificultou as análises de metabolismo. Por fim, a impossibilidade de realizar ensaios diretamente nas gotas, exigindo a transferência dos esferoides para outras microplacas, foi também considerada como limitante.

Com relação aos cultivos dependentes de suporte, em Matrigel e HydroMatrix, o tempo de agregação dos esferoides RT4 foi de 96 horas, e houve a geração de mais de um esferoide por poço. Houve aumento no tamanho dos esferoides RT4 em ambos os cultivos, porém, os esferoides cultivados em HydroMatrix apresentaram uma variação de tamanho de até 4 vezes, enquanto que o tamanho dos esferoides RT4 em Matrigel aumentou apenas 2,3 vezes aproximadamente. Em nenhuma das técnicas, houve formação de esferoides com mais de 200 µm de diâmetro, não atingindo os tamanhos considerados ideais para a recuperação de algumas

características patofisiológicas do tumor. Ambas as técnicas geraram esferoides esféricos e com superfície regular, no entanto, foi também nos cultivos em Matrigel que houve maior frequência de esferoides com IE superior a 0,90, quando comparados com os cultivos em HydroMatrix. Foi no cultivo com esferoides de menor tamanho, utilizando Matrigel, que se observaram os maiores valores de fator de expansão, sendo superiores também aos observados nas culturas 2D. Os esferoides de ambas as técnicas apresentaram células apoptóticas, sendo no HydroMatrix a maior incidência.

Assim como nos cultivos livres de suporte, foi observada uma preferência das células por glutamina nos cultivos em Matrigel e HydroMatrix, que também consumiram glicose. Esse comportamento provavelmente foi em decorrência do elevado crescimento, evidenciado pelos altos valores de fator de expansão. Logo, entre as duas técnicas, o maior consumo de ambos os nutrientes foi observado nos esferoides RT4 gerados em Matrigel. Quanto aos aspectos técnicos, o plaqueamento dos cultivos em HydroMatrix foi classificado como difícil, devido às várias etapas de preparação do hidrogel e à temperatura controlada na hora do plaqueamento. Para ambas as técnicas, o parâmetro monitoramento foi classificado como intermediário, uma vez que as densas redes de polímero muitas vezes dificultaram o monitoramento dos esferoides em microscópio. A troca do meio de cultura também foi um desafio, uma vez que qualquer perturbação na cultura poderia levar a uma ruptura da estrutura polimérica onde os esferoides estavam embebidos.

Por fim, a formação de mais de um esferoide por poço em ambas as técnicas resultou em baixa reprodutibilidade quanto à geração de esferoides com as mesmas características de tamanho e forma, não só entre os poços de uma mesma condição, como também entre os esferoides de um mesmo poço. No entanto, quando se compararam os resultados entre as duas técnicas, notou-se que as culturas em Matrigel geraram esferoides RT4 com maior uniformidade de tamanho e forma.

Segundo Leung *et al*. (2015), o aprimoramento de técnicas que garantam a reprodutibilidade entre os esferoides formados pode contribuir para padronizar e aumentar a fidelidade dos perfis de gradiente que são desejáveis nos modelos *in vitro* para a seleção de compostos. Portanto, a geração de esferoides com menos variações de forma e tamanho é um dos fatores mais relevantes para a escolha de uma boa técnica de cultivo 3D (LEE *et al*., 2018b). Esferoides com propriedades

diferentes resultarão em respostas diferentes, aumentando a variabilidade dos resultados (ASGHAR *et al*., 2015; ZANONI *et al*., 2016).

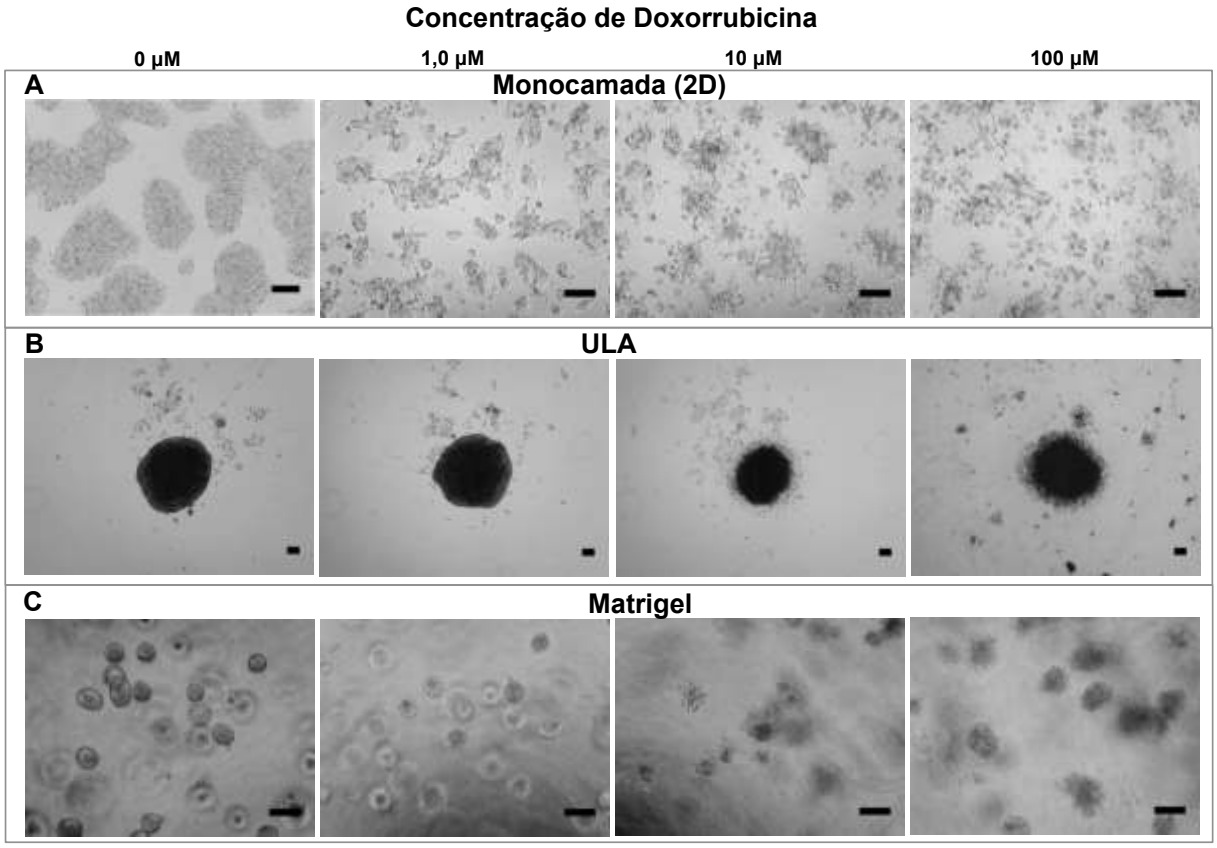
Frente ao exposto, para a continuidade do trabalho foi selecionada a técnica de flutuação forçada, utilizando microplacas de 96 poços ULA para a geração de esferoides em sistemas livres de suporte, e a técnica de cultivo em Matrigel para a geração dos esferoides RT4 em sistemas de cultivo dependentes de suporte.

Os cultivos de esferoides RT4 em ULA e Matrigel foram analisados quanto à sensibilidade ao fármaco DOX e ao perfil de expressão de alguns genes que são superexpressos nos tumores sólidos. Levando em consideração o tamanho dos esferoides formados em cada técnica, as condições selecionadas foram: esferoides iniciados com 2.500 células/poço e cultivados por 72 horas para as culturas em ULA, e esferoides iniciados com 2.000 células/poço cultivados por 192 horas para as culturas em Matrigel.

5.1.5 Sensibilidade dos cultivos 2D e 3D à Doxorrubicina

Os esferoides RT4 gerados pela técnica de flutuação forçada utilizando microplacas de 96 poços ULA e pela técnica de cultivo em Matrigel foram expostos a diferentes concentrações de DOX, 0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 μM, por 24 horas. Os experimentos também foram realizados com células RT4 cultivadas em monocamada para fins comparativos (Figura 26). Logo na concentração de 1,0 μM de DOX foi possível observar um grande número de células mortas nas culturas 2D, caracterizado pela perda da morfologia natural e diminuição da confluência (Figura 26A). Tal comportamento era esperado devido à igual exposição de todas as células à mesma quantidade de fármaco e à ausência de qualquer barreira física. Nessa mesma concentração, algumas alterações morfológicas e de tamanho também foram observadas no esferoides RT4 das culturas em Matrigel (Figura 26C). Os esferoides RT4 das culturas em ULA se mostraram morfologicamente mais intactos, sofrendo alterações a partir da concentração de 10 μM (Figura 26B). Conforme as células vão morrendo, elas se desprendem do esferoide, formando uma nuvem de *debris* e células mortas que envolve a estrutura tridimensional. Esse evento é decorrente da ação da DOX, que age em células em estado de proliferação ativa (CHITCHOLTAN; SYKES; EVANS, 2012; WEN *et al*., 2013) que se encontram nas camadas mais externas do esferoide.

Figura 26. Cultivos de células RT4 em monocamada, ULA, HD, Matrigel e HydroMatrix pré e pós-tratamento com Doxorrubicina

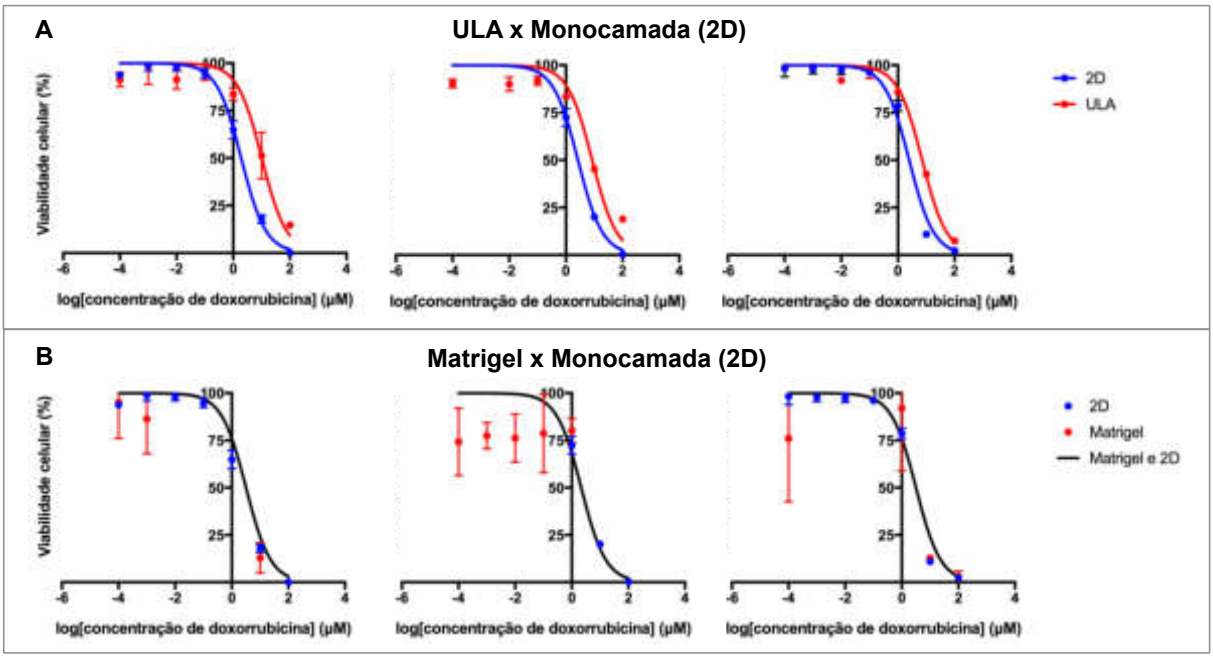


Cultivos de células RT4 pré e pós-tratamento com 1, 10 e 100 μM de Doxorrubicina por 24 horas. (A): as células RT4 foram plaqueadas em monocamada com número inicial de 2.000 células/poço e cultivadas por 24 horas previamente aos tratamentos. (B): as células RT4 foram plaqueadas em microplacas ULA com número inicial de 2.500 células/poço e cultivadas por 72 horas previamente aos tratamentos. (C): as células RT4 foram plaqueadas em Matrigel com número inicial de 2.000 células/poço e cultivadas por 192 horas previamente aos tratamentos. Microscopia de contraste de fase em campo claro, aumento de 10X (A e C) e aumento de 4X (B), barra de escala = 100 μm.
Fonte: autoria própria.

As curvas de dose-resposta obtidas para os cultivos 3D, comparadas com as curvas obtidas para o 2D, em triplicata, são mostradas na Figura 27. Diferenças estatísticas nas curvas de resposta ao fármaco DOX entre as culturas 2D e 3D foram observadas somente nos cultivos utilizando microplacas ULA (Figura 27A). A média dos valores de IC_{50} para o cultivo em 2D foi de 2,35 ± 0,39 µM, enquanto que para as culturas em ULA esse valor foi de 8,62 ± 1,53 µM (Tabela 8). Diferentemente dos esferoides em Matrigel, o aumento significativo no valor do IC_{50}, de aproximadamente 4 vezes, nesse cultivo 3D indicou menor sensibilidade dos esferoides RT4 gerados nesses cultivos ao fármaco testado. Gencoglu *et al*. (2018)

relataram que esferoides gerados com células de uma mesma linhagem celular podem apresentar diferentes respostas de sensibilidade ao tratamento com fármaco dependendo do tipo de técnica 3D utilizado na geração desses esferoides. O trabalho foi realizado com um total 27 linhagens, distribuídas entre câncer de mama, ovário e próstata, que foram cultivadas como esferoides em géis de polipeptídeos, em microplacas e em suspensão.

Figura 27. Viabilidade celular dos cultivos de células RT4 em monocamada, ULA e Matrigel após tratamento com Doxorrubicina



Curvas de dose-resposta em escala logarítmica dos cultivos de células RT4 tratados com 0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100 μM de Doxorrubicina por 24 horas. (A): diferenças entre a viabilidade celular dos cultivos em ULA (linha avermelhada) e em monocamada (linha azulada) após tratamento. (B): viabilidade celular dos cultivos em Matrigel e em monocamada (linha preta) após tratamento. A viabilidade celular foi determinada indiretamente por ensaio de luminescência utilizando 3D CellTiter-Glo (Promega). Resultados apresentados de 3 experimentos independentes. Pontos azulados ou avermelhados apresentados como a média das viabilidades celulares ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: autoria própria.

Tabela 8 – Média dos valores de IC_{50} (μM), e desvio-padrão, obtidos nas diferentes curvas de dose-resposta para cada um dos diferentes cultivos

	2D	ULA	Matrigel
IC_{50} (μM)	2,35 ± 0,39	8,62 ± 1,53*	3,31 ± 1,28

Soma de quadrados extras com teste estatístico F, com $p<0,05$.
* Diferença em relação ao cultivo 2D.

Vários estudos compararam o efeito de fármacos antineoplásicos em culturas 2D e 3D usando diferentes linhagens celulares tumorais (ADCOCK, 2015; BAEK *et al*., 2016; OLIVEIRA *et al*., 2016; WAN *et al*., 2016), e a maioria aponta para uma menor sensibilidade das células aos tratamentos, quando cultivadas em 3D (GURSKI *et al*., 2010; HONGISTO *et al*., 2013; BRESLIN & O'DRISCOLL, 2016; SANT & JOHNSTON, 2017). Esse comportamento pode estar associado a vários fatores envolvidos nos chamados “mecanismos de resistência” que podem ser observados em tumores sólidos.

Um desses fatores, por exemplo, é a própria arquitetura 3D dos tumores e esferoides, que forma uma verdadeira barreira física à penetração do fármaco, devido às fortes interações célula-célula e célula-MEC. Essa característica pode levar a diferenças quanto à acessibilidade e disponibilidade do fármaco a todas as células que compõem o tumor ou esferoide (EDMONDSON *et al*., 2014; GALATEANU *et al*., 2016; KAUSHIK *et al*., 2018, NUNES *et al*., 2019). A cinética de difusão do fármaco é um fator essencial a ser considerado, uma vez que influenciará de forma direta a resposta celular dos tumores e esferoides. Nos esferoides, trabalhos têm mostrado que essa taxa de difusão é influenciada principalmente pelo tamanho, compactação e circularidade (ou esfericidade) desses esferoides (LEUNG *et al*., 2015). Quanto maiores e mais compactos os esferoides, maior a força de resistência dessa barreira física e menor a difusão dos fármacos (GONG *et al*., 2015).

O tamanho dos esferoides está associado também à limitação na difusão de oxigênio, levando ao possível desenvolvimento de um microambiente hipóxico no seu núcleo. Em tumores sólidos, a hipóxia pode levar à ativação de genes envolvidos na sobrevivência celular e resistência das células à ação dos fármacos, como discutido em muitos trabalhos (TRÉDAN *et al*., 2007; DASTER *et al*., 2017; MANSOORI *et al*., 2017; RIFFLE & HEDGE, 2017). A ativação do *HIF-1α*, devido ao ambiente hipóxico, e a regulação positiva da expressão de outras proteínas associadas à resistência de tumores são muitas vezes observadas apenas em culturas 3D, e não em 2D (QIN *et al*., 2016; TERASHIMA *et al*., 2016).

Além da difusão limitada do fármaco nas camadas do esferoide e da expressão de HIF-1α, Lin *et al*. (2017) elencam outros mecanismos que podem contribuir para a resistência em tumores de bexiga, como o bombeamento ativo dos fármacos para fora da células, a decomposição enzimática dos fármacos ou subprodutos do seu

metabolismo (tornando-os ineficazes), o escape de mecanismos de morte celular devido à ação de proteínas antiapoptóticas e a regulação de citocinas ou outros compostos que inibem resposta imune.

A difusão limitada da DOX para todas as células pode ser um dos motivos associados à menor sensibilidade dos esferoides RT4 gerados em ULA ao fármaco. A formação de uma barreira física pode ter sido resultado do tamanho grande (faixa de 400 a 500 μm) e provável compactação (bons resultados obtidos nos parâmetros de forma), como mostraram os resultados obtidos pela caracterização. De maneira oposta, as células RT4 nas culturas em monocamada foram uniformemente expostas à DOX. Nos resultados obtidos na caracterização dos esferoides em Matrigel foi observado que, por possuírem tamanhos pequenos (máximo 100 μm), estes apresentaram maior número de células proliferativas. Essas células são o principal alvo da DOX, o que justifica a maior sensibilidade desses esferoides ao tratamento e valores de IC_{50} próximos aos dos cultivos 2D.

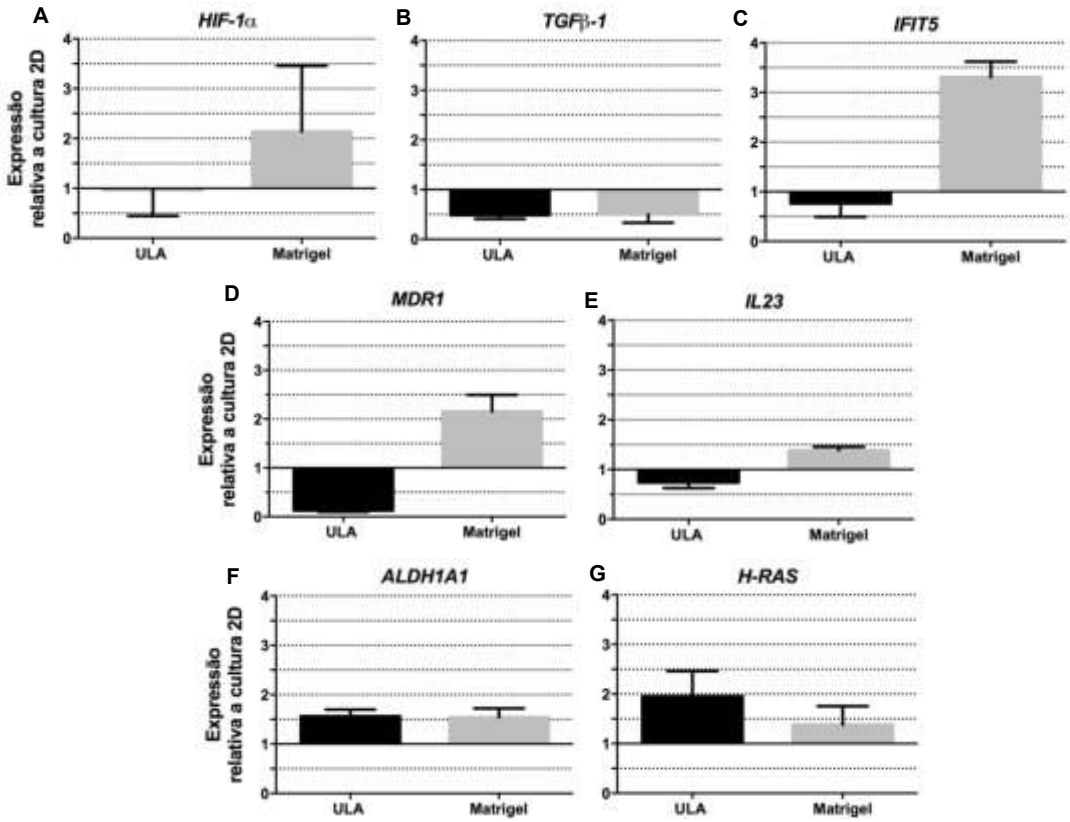
Com relação aos outros possíveis mecanismos citados, a expressão de *HIF-1α*, de genes antiapoptóticos e genes envolvidos na decomposição enzimática dos fármacos e subprodutos foi analisada na seção 5.1.6.

5.1.6 Perfil de expressão gênica dos cultivos 3D

A extensa diversidade genética entre as células de um mesmo tumor surge já nos estágios iniciais da tumorigênese (CHEN *et al*., 2015). Portanto, variações na expressão de alguns genes podem ser observadas já em células que compõem modelos de tumores sólidos iniciais, como os esferoides. A atuação desses genes pode persistir durante a progressão do tumor, estando associada às atividades de metástase, como mostrado nos estudos de Campbell *et al*. (2010) e Stephens *et al*. (2011). Vários outros estudos mostram que alguns genes, que são conhecidos por serem comumente superexpressos nos tumores sólidos, foram mais expressos nos esferoides do que nas culturas 2D (BINGEL *et al*., 2017; PEARCE *et al*., 2018). Além disso, segundo Gencoglu *et al*. (2018), mesmo que diferentes técnicas de cultivo produzam esferoides semelhantes com a mesma linhagem celular, diferenças podem ser observadas quanto ao perfil de expressão gênica. Portanto, comparou-se o perfil de expressão de alguns genes comumente superexpressos em tumores

sólidos dos esferoides RT4 em ULA e Matrigel, tendo como referência a expressão em cultivos 2D (Figura 28).

Figura 28. Expressão gênica das células RT4 nos cultivos em ULA e Matrigel em relação aos cultivos em monocamada



Expressão gênica das células RT4 cultivadas em 3D (ULA e Matrigel) em relação ao cultivo em monocamada. Esferoides RT4 das culturas em ULA e Matrigel iniciadas com 2.500 e 2.000 células/poço. (A): expressão do gene *HIF-1* α; (B): expressão do gene *TGFβ-1*; (C): expressão do gene *IFIT5*; (D): expressão do gene MDR-1; (E): expressão do gene *IL23*; (F): expressão do gene *ALDH1A1*; (G): expressão do gene *H-RAS.* Dados mostram as médias relativas de expressão ± desvio-padrão de 3 ensaios independentes (n=3).
Fonte: autoria própria.

Dentre os 7 genes possivelmente superexpressos em tumores sólidos analisados neste trabalho, o cultivo de esferoides RT4 em Matrigel apresentou maior expressão para 6 deles (valores aproximados): *HIF-1α* (2 vezes), *IFIT5* (3,5 vezes), *MDR-1* (2 vezes), *IL23* (1,5 vezes), *ALDH1A1* (1,5 vezes) e *H-RAS* (1,5 vezes). Os esferoides RT4 em ULA apresentaram maiores níveis de expressão apenas para os genes *ALDH1A1* (1,5 vezes) e *H-RAS* (2 vezes).

O gene *HIF-1α* codifica HIF-1α, que é ativado em condições de hipóxia. A geração de um núcleo com baixa disponibilidade de oxigênio e células necróticas é uma das principais características de tumores sólidos. Esse fator, como discutido

anteriormente, está associado à regulação positiva da expressão de outras proteínas associadas à resistência de tumores, como os fatores antiapoptóticos, VEGF, GLUT-1, entre outros (ROHWER & CRAMER, 2011), e reguladores da angiogênese. Como os esferoides RT4 produzidos em ULA apresentaram tamanho entre 300 e 500 μm e menor sensibilidade ao tratamento com DOX, esperava-se maior expressão desse gene nesses esferoides quando comparados aos cultivos 2D (QIN *et al*., 2016; TERASHIMA *et al*., 2016). No entanto, os resultados mostraram que não houve maior expressão de *HIF-1α* nos esferoides RT4 gerados em ULA quando comparados às culturas em monocamada (Figura 28A). Mesmo apresentando tamanhos maiores e aparente grau elevado de compactação, a difusão de oxigênio pelas camadas que compõem o esferoide RT4 parece não ter sido um limitante, como inferido anteriormente.

Já nos esferoides RT4 gerados em Matrigel, o HIF-1α foi quase duas vezes mais expresso; esses esferoides não foram menos sensíveis ao tratamento de DOX nem apresentaram tamanhos maiores que 100 μm. A geração de uma região de hipóxia nesses esferoides pode estar associada a outros dois fatores: a uma alta taxa de consumo de oxigênio pelas células proliferativas da camada externa, uma vez que os resultados de caracterização mostraram que esses esferoides apresentaram altos valores de expansão celular (alta taxa proliferativa); ou ao tempo de cultivo. Uma vez que os ensaios de expressão gênica nos cultivos em ULA foram realizados em esferoides RT4 com 72 horas de cultivo e, nos cultivos em Matrigel, em esferoides com 192 horas de cultivo (120 horas a mais), o tempo de cultivo pode ter influenciado na geração de uma região de hipóxia nos esferoides RT4.

Os genes *TGFβ-1* e *IFIT5* estão relacionados à transição epitélio-mesênquima em tumor de bexiga (HUANG *et al*., 2019). Em nenhum cultivo 3D foi observada maior expressão do gene *TGFβ-1*, e apenas os esferoides RT4 em Matrigel apresentaram maior expressão de *IFIT5* (aproximadamente 3 vezes) em relação à cultura 2D (Figura 28B). A transição epitélio-mesenquimal (TEM) é um processo fisiológico reversível e está relacionado à atividade de metástase no tumor, recuperação de características de células-tronco e resistência a fármacos. Durante a TEM, ocorre a perda de marcadores epiteliais, como E-caderinas, e aumento na expressão dos repressores transcricionais ZEB1 e ZEB2 (do inglês, *zinc finger E-box-binding homeobox* 1 e 2) (TRAN *et al*., 2013). As células perdem a polaridade e o potencial de adesão célula-célula e célula-MEC, e passam a demonstrar

capacidade migratória e invasiva (MCCONKEY *et al*., 2009). A TGFβ-1 pertence a uma família de proteínas que regulam atividades celulares como proliferação celular, diferenciação, apoptose, interações com MEC e reatividade imune (MASSAGUÉ, 2008). O papel dessa proteína no mecanismo de TEM foi recentemente descrito nos tumores de bexiga (LIU *et al*., 2015). No entanto, Stojnev *et al*. (2019) mostraram recentemente que a alta expressão dessa proteína está fortemente associada a um estágio mais invasivo do tumor de bexiga. Portanto, mesmo que os esferoides RT4 gerados pudessem recapitular o mecanismo de TEM dos tumores sólidos, dificilmente observaríamos altas expressões de *TGFβ-1*, uma vez que as células RT4 são originadas de um tumor com baixo grau de agressividade.

O papel do *IFIT5* foi relacionado à via de promoção da TEM em câncer renal e de próstata. O complexo IFIT5 seria responsável por degradar precursores de microRNAs como o pré-miR363, pré-miR101 e pré-miR128, que, por sua vez, são supressores da via TEM (LO *et al*., 2019). A associação com câncer de bexiga foi feita por Huang *et al*. (2019), que mostram que o IFIT5 pode degradar o miR99, que, por sua vez, é responsável por ativar a CAM1, promotora da TEM em câncer de bexiga. Não houve maior expressão de IFIT5 nos esferoides RT4 em ULA (Figura 28C). Já as culturas em Matrigel apresentaram maior expressão em relação às culturas 2D. Sabe-se que as propriedades físicas e químicas da MEC podem alterar o comportamento das células tumorais *in vivo*, como, por exemplo, a capacidade de migração e invasão (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; MOUW; OU; WEAVER, 2014). As alterações na rigidez da MEC, em função da deposição de proteínas, por exemplo, exercem influências por meio da mecanotransdução (HANDORF *et al*., 2015), maquinaria molecular celular interna pela qual as células respondem aos sinais físicos, convertendo-os em sinais elétricos ou químicos (PETRIDOU; SPIRÓ; HEISENBERG, 2017). Possivelmente, a presença de uma matriz, como o Matrigel, pode ter estimulado um aumento na proporção de células RT4 com compartamentos mais mensenquimal nesses esferoides, explicando a maior expressão do gene *IFIT5* com relação à cultura 2D e às outras culturas 3D sem hidrogel (GRINNELL, 2000).

O mesmo perfil de expressão foi observado para o gene *MDR-1*: não houve maior expressão nos esferoides RT4 em ULA, mas houve nos esferoides em Matrigel (Figura 28D). O gene *MDR-1* codifica a P-gp, uma transportadora de membrana que é capaz de remover compostos de dentro das células, como a DOX (ZAHREDDINE & BORDEN, 2013), e faz parte do mecanismo de resistência a

múltipla drogas (ROH *et al*., 2018). Estudos mostram que há maior expressão da P-gp em esferoides tumorais (WARTENBERG, 2003), o que corrobora os dados obtidos para esferoides RT4 em Matrigel, que apresentaram uma expressão cerca de 2 vezes maior que as culturas 2D. No entanto, o mesmo era esperado para as culturas em ULA, uma vez que estas se mostraram menos sensíveis à DOX, e a glicoproteína-P poderia estar envolvida no baixo acúmulo de DOX dentro das células. A maior expressão de *MDR-1* também foi relacionada a uma maior expressão de *HIF-1α* em esferoides de câncer de mama MCF-7 (DOUBLIER *et al*., 2012).

O gene I*L23* codifica a interleucina-23, responsável por ativar genes antiapoptóticos em tumores de bexiga (LI *et al*., 2017). As interleucinas estão envolvidas na ativação de alguns genes antiapoptóticos que codificam as proteínas cFLIP (do inglês, *cellular FLICE-like inhibitory protein*), FLAME-1 (do inglês, *FADD-like antiapoptotic molecule 1*) e Bcl-xL (TODARO *et al*., 2007), agindo na cadeia STAT-3 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*), que promove sobrevivência tumoral, proliferação, invasão e angiogênese. Li *et al*. (2017) associaram a maior expressão de *IL23* à resistência em tumores de bexiga. A maior expressão de *IL23* em cultivos em Matrigel (Figura 28E) não corrobora os resultados de atividade apoptótica obtidos anteriormente, uma vez que, em 192 horas de cultivo, houve aumento na atividade apoptótica desses cultivos (Figura 23).

Por fim, a expressão dos genes *ALDH1A1* e *H-RAS* foi maior em ambos os cultivos 3D, quando comparados ao 2D (Figura 28F e G). O gene *ALDH1A1* codifica o membro A1 da retinaldeído desidrogenase 1 (ALDH1A1), uma enzima que está envolvida em diversos processos tumorais, como metástase, latência e recorrência, e é utilizada como marcador da plasticidade tumoral, ou seja, na identificação de CTTs (ROBERTSON *et al*., 2010; CLEVERS, 2011; FRANCO *et al*., 2016). Basicamente, as enzimas dessa família catalisam a oxidação de substratos aldeídos endógenos (gerados durante metabolismo de aminoácidos, álcoois, lipídios e vitaminas) e exógenos (que podem ser provenientes do metabolismo de fármacos, como os citotóxicos) aos seus correspondentes ácidos carboxílicos (KIEFER *et al*., 2012). Por essa razão, as enzimas ALDH, principalmente as ALDH1A1, são referidas por exercer uma ação desintoxicante, uma vez que protegem as células da ação citotóxica desses aldeídos provenientes do metabolismo dos fármacos (VASILIOU & NEBERT, 2005). Em modelos xenográficos tumorais, foi observada a

oxidação e inativação de fármacos, como a ciclofosfamida, pelas enzimas ADLH (MATSUI *et al*., 2008; HIRST *et al*., 2018).

Portanto, a superexpressão dos genes *ALDH1A1* em células tumorais está relacionada a um perfil de resistência. A expressão de ALDH1A1 já foi reportada em todas as linhagens celulares de carcinoma urotelial, e, considerando um cultivo de células RT4, cerca de 4,0% são positivas para a expressão de *ALDH1A1* (INOUE *et al*., 2017). A menor sensibilidade à DOX observada nos esferoides RT4 em ULA pode estar associada a essa maior expressão (1,5 vezes) de *ALDH1A1*. Além disso, há relatos com a linhagem celular de câncer cervical mostrando que os esferoides gerados com essas células têm maior expressão de *ALDH1A1* que os cultivos em 2D (VALENCIA-GONZALES *et al*., 2019).

Trabalhos têm mostrado que a superexpressão de *ALDH1A1* provavelmente ocorre nas subpopulações de CTTs presentes nos tumores. De fato, a ALDH é altamente expressa em CTTs de tumores de bexiga (LI *et al*., 2017). A propriedade de resistência das CTTs em tumores de bexiga do tipo papilar é considerada uma das principais responsáveis pelas altas taxas de resistência e recorrência desse câncer (TRAN *et al*., 2010). O surgimento de células com esse fenótipo de plasticidade nos estágios avançados do tumor pode estar associado a um fenômeno de transformação das células tumorais de bexiga adultas em CTTs através dos mecanismos de TEM, desdiferenciação e hipóxia (BRYAN, 2011). Os trabalhos de Kurtova *et al*. (2015) com células de tumor de bexiga mostraram uma espécie de recrutamento de CTTs quiescentes estimulado por danos induzidos pela quimioterapia. Esse mecanismo pode estar envolvido com o fenômeno de replicação inesperada de células tumorais que acontece, em alguns casos, entre os ciclos de quimioterapia no paciente. Kondo (2007) mostrou que muitas linhagens celulares de leucemia, câncer de mama e cérebro podem conter CTTs. Nos tumores neurais, o número de CTTs pode variar de 1 a 30% (GILBERT & ROSS, 2009). Os experimentos realizados neste trabalho são insuficientes para identificar a presença de CTTs nos esferoides RT4, no entanto, Falso, Buchholz e White (2012) já isolaram com sucesso CTTs de células das linhagens de câncer de bexiga TCCSUP, T24 e 5637.

Outro mecanismo atribuído à resistência nos tumores de bexiga é a inibição da morte celular programada (apoptose) (LI *et al*., 2017). Estudos mostram que células-tronco normais com mutação nos genes *H-RAS* podem se transformar em CTTs de

câncer de bexiga, que se desenvolvem em um tumor superficial não invasivo (CORDON-CARDO, 2008). O gene *H-RAS* codifica a proteína transformadora p21 que está envolvida no mecanismo de reparo dos danos causados ao DNA (WANG; ZHANG; CHEN, 2019). A DOX é um quimioterápico da família das antraciclinas, uma intercalante de DNA que interfere na atividade de enzimas envolvidas na replicação do DNA durante o ciclo celular, como a topoisomerase II. Por essa razão, sua ação é mais expressiva em células que se encontram em estado proliferativo (WEN *et al*., 2013). A DOX também age gerando EROs, que causarão danos no DNA (WIGERUP; PAHLMAN E BEXELL, 2016). Tanto a inibição da topoisomerase II quanto a formação de EROs podem conduzir a célula tumoral à apoptose. Portanto, um dos mecanismos de resistência das células tumorais à ação de fármacos, como a DOX, pode estar relacionado à maior expressão de genes antiapoptóticos, como a proteína p21 codificada pelo gene *H-RAS.* A proteína p21 age bloqueando o ciclo celular em G1 para que o reparo do DNA seja realizado e a célula não entre em apoptose (WANG; ZHANG; CHEN, 2019). Nesse contexto, pode-se inferir que a baixa sensibilidade à DOX observada nos esferoides RT4 gerados em ULA pode também estar associada à expressão do gene *H-RAS*, que foi 2 vezes mais expresso nessas culturas do que nas culturas 2D (Figura 28G).

Como já discutido, os mecanismos de resistência em tumores podem estar associados a diferentes fatores. Portanto, além da ação desintoxicante da ALDH1A1 e da alta atividade antiapoptótica da proteína p21, a sensibilidade à DOX observada nos esferoides RT4 gerados em ULA também pode envolver outros processos que exigem análises moleculares e fenotípicas mais profundas.

Os resultados obtidos na primeira parte do trabalho mostraram que diferentes sistemas e técnicas de cultivo 3D de fato levaram à geração de esferoides RT4 com diferentes características, não só as relacionadas aos aspectos morfológicos, de crescimento celular e metabolismo, mas também as relacionadas à sensibilidade a fármacos neoplásicos e expressão gênica. Enquanto nos cultivos em ULA geraram-se esferoides únicos, de grande tamanho e que mimetizaram uma possível resposta de resistência ao tratamento com DOX, nos cultivos em Matrigel, os esferoides pareceram recapitular um perfil de expressão gênica mais fiel ao que se pode esperar de um tumor sólido.

5.2 CULTURAS 3D COM CÉLULAS PRIMÁRIAS HUMANAS DE CÂNCER DE BEXIGA

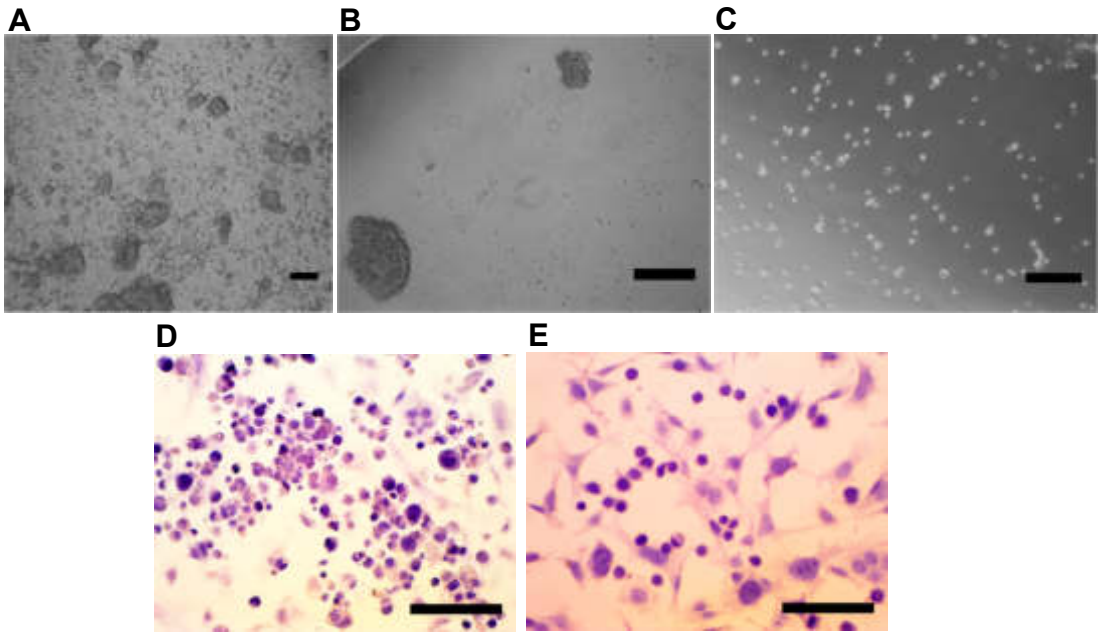
Após a geração e caracterização de esferoides com a linhagem celular RT4 em diferentes sistemas e técnicas de cultivo 3D, a segunda etapa do projeto focou no estabelecimento de cultivos 3D utilizando células primárias de tumor de bexiga humano provenientes de modelos PDX. Para isso, combinaram-se as técnicas de cultivo 3D selecionadas anteriormente. O principal foco dessa segunda etapa foi comparar respostas de sensibilidade a fármacos obtidas nesses cultivos 3D *in vitro* com os resultados obtidos *in vivo*, com o PDX de origem.

5.2.1 Geração dos cultivos 3D BL0293 e BL0808

A expansão das células tumorais de pacientes em modelos *in vivo*, como nos PDX, antes de cultivá-las *in vitro* pode ser uma estratégia interessante devido à limitação quanto à disponibilidade de material proveniente de biópsias (YOSHIDA, 2020). No entanto, após a expansão, as massas tumorais serão constituídas não só por células tumorais humanas, mas também por células estromais de origem murina. Métodos eficientes de processamento desses tumores após coleta são importantes na tentativa de isolar as células tumorais humanas das estromais. Por essa razão, primeiramente, testaram-se diferentes protocolos para a digestão dos tumores PDX BL0293 e BL0808 coletados, que foram combinados com técnicas de isolamento das células tumorais (MITRA & MISHRA, 2013; TURIN *et al*., 2014; DOHMEN *et al*., 2015; OWEN *et al*., 2016; JANIK *et al*., 2016).

A melhor estratégia envolveu a digestão parcial das massas tumorais com solução contendo as enzimas Colagenase tipo I e Dispase a 37 °C. As enzimas permitiram digestão do tecido conjuntivo, mas o tempo de incubação reduzido impediu que os aglomerados tumorais fossem dissociados em células individuais. O resultado foi uma suspensão de células estromais individuais e aglomerados maiores de células tumorais (Figura 29A).

Figura 29. Células tumorais e estromais primárias provenientes dos modelos PDX de câncer de bexiga



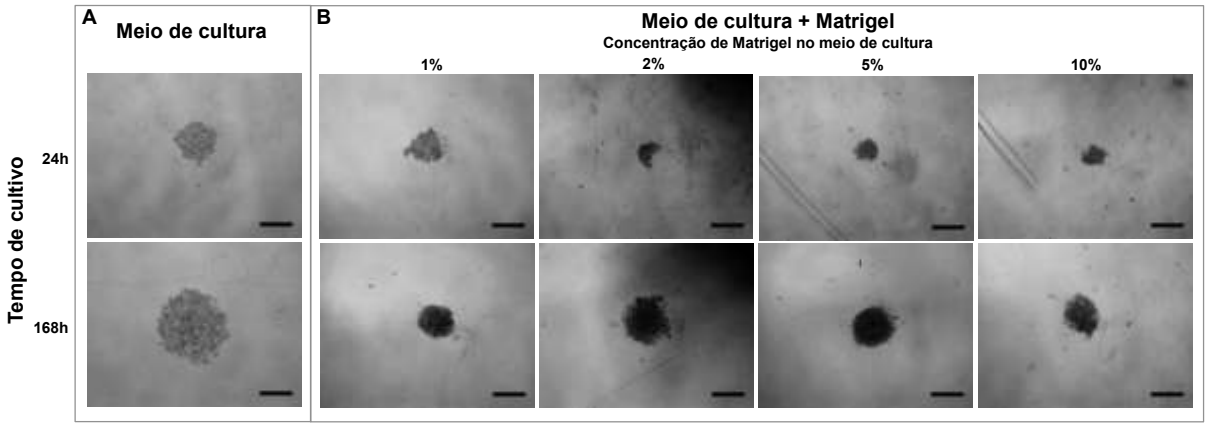
(A): agregados de células tumorais BL0293 e células estromais individuais após digestão química. (B): agregados de células tumorais BL0293 após ciclos de centrifugação para exclusão das células estromais; (C): células tumorais BL0293 individuais após dissociação completa dos agregados com a enzima Tripsina. (D): cultivo em monocamada das células tumorais BL0293 em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina. (E): cultivo em monocamada das células tumorais BL0808 em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina. Células tumorais = tom arroxeado/azulado. Fibroblastos = tom rosado. Microscopias de contraste de fase em campo claro, aumento de 4X e barra de escala = 100 μ m (A), aumento de 10X e barra de escala de 100 μ m (B, C), aumento de 40X, barra de escala = 100 μ m (D, E).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

Utilizando filtros e ciclos rápidos de centrifugação (30 segundos a 1 minuto), foi possível separar os aglomerados tumorais da maioria das células estromais individuais (Figura 29B). Os aglomerados tumorais foram então dissociados em células individuais utilizando solução enzimática de tripsina (Figura 29C). Após coloração com solução de H&E, foi possível observar a predominância de células tumorais (arroxeadas ou azuladas) em comparação com fibroblastos (rosados) tanto nas culturas de células BL0293 quanto nas culturas BL0808 (Figura 29D, E).

Com base nos resultados obtidos na primeira etapa do projeto com a linhagem RT4, a técnica selecionada para o cultivo 3D das células BL0293 e BL0808 foi a de flutuação forçada em microplacas de 96 poços ULA de fundo côncavo. Optou-se também pela estratégia de suplementar o meio de cultura RPMI padrão com Matrigel, uma vez que foi mostrado que esse hidrogel pode ter influenciado o perfil de expressão das células tumorais RT4, ao mimetizar algumas das condições químicas da MEC. Para que fosse gerado apenas um esferoide por poço, conferindo

maior reprodutibilidade, foram utilizadas concentrações de Matrigel inferiores à utilizada nas culturas RT4. As concentrações de 1,0; 2,0; 5,0 e 10% (v/v) de Matrigel foram testadas nas culturas de células BL0293 com número inicial de 1.000 células/poço. Como controle, as células BL0293 também foram cultivadas em meio de cultura RPMI padrão sem suplementação de Matrigel (Figura 30).

Figura 30. Cultivos das células BL0293 em microplacas ULA com e sem Matrigel em 24 e 168 horas de cultivo

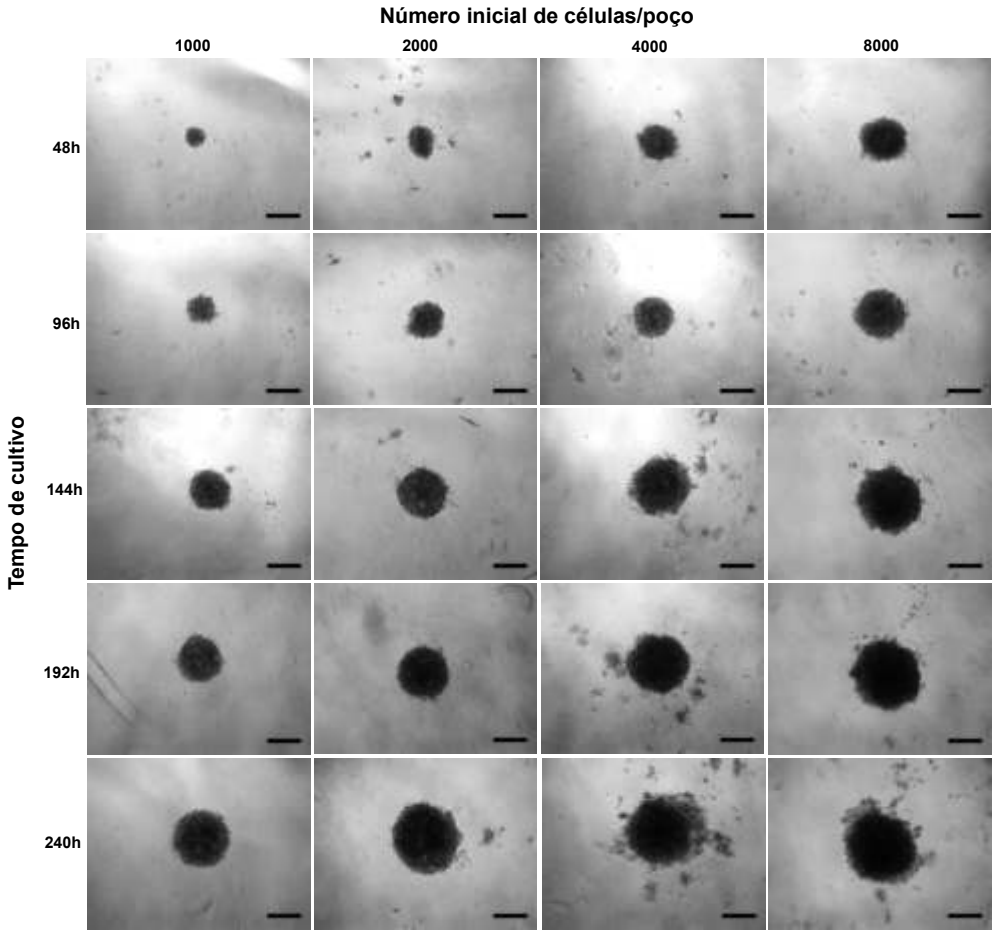


(A): meio de cultura McCoy padrão. (B): meio de cultura padrão suplementado com 5% de Matrigel (v/v). Microscopia de contraste de fase em campo claro, aumento de 10X, barra de escala = 500 μ m. Fonte: autoria própria.

De acordo com as microscopias obtidas em 24 e 168 horas, não houve agregação das células BL0293 e formação de esferoides nos cultivos apenas com meio de cultura sem suplementação de Matrigel. A geração de agregados tumorais com células primárias provenientes de modelos PDX de câncer de bexiga era já uma dificuldade relatada pelo grupo de pesquisa do Professor Pan, que realizou os experimentos. O uso de Matrigel auxiliou na agregação das células, e foi possível gerar esferoides BL0293 (Figura 30B). Visto que nas concentrações de 1 e 2% os agregados ainda encontravam-se ligeiramente frouxos durante a manipulação e que na concentração de 10% já houve uma redução no tamanho do agregado, a condição de 5% (v/v) de Matrigel em meio de cultura RPMI padrão foi selecionada.

As células BL0293 e BL0808 foram, portanto, cultivadas em meio de cultura RPMI padrão suplementado com 5% de Matrigel (v/v), com números iniciais de 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 células/poço, durante 240 horas (Figura 31).

Figura 31. Cultivos 3D dos esferoides BL0293 em microplacas ULA com 5% Matrigel ao longo de 240 horas de cultivo

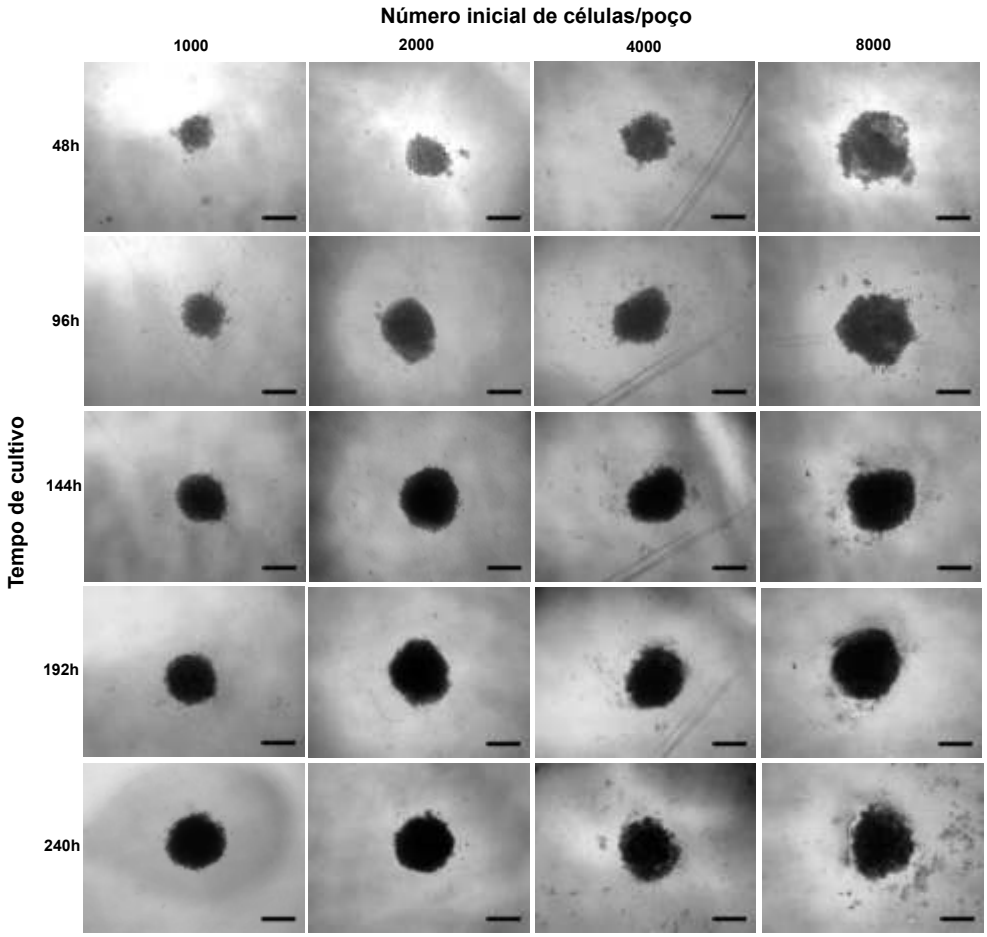


Meio de cultura RPMI padrão suplementado com 5% de Matrigel. Microscopia de contraste de fase de campo claro, aumento de 10X, barra de escala = 500 μ m.
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

Nos cultivos dos esferoides BL0293, foi possível observar o processo de agregação das células já nas primeiras 48 horas de cultivo em todos os números iniciais de células utilizados (Figura 31). Um único esferoide se formou em cada poço, porém, células individuais ou pequenos aglomerados de células ao redor dos esferoides foram observados a partir de 144 horas de cultivo nas culturas iniciadas com 4.000 e 8.000 células/poço. Os esferoides BL0293 das culturas iniciadas com 1.000 células/poço foram os que se mantiveram mais íntegros até o final do cultivo.

Nos cultivos dos esferoides BL0808, notou-se um grau de agregação menor nas primeiras 48 horas de cultivo quando comparados aos esferoides BL0293 (Figura 32).

Figura 32. Cultivos 3D dos esferoides BL0808 em microplacas ULA com 5% Matrigel ao longo de 240 horas de cultivo



Meio de cultura RPMI padrão suplementado com 5% de Matrigel. Microscopia de contraste de fase de campo claro, aumento de 10X, barra de escala = 500 μ m.
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

Contudo, foi possível formar esferoides únicos em todos os números iniciais de células utilizados, sendo os melhores resultados observados nas culturas iniciadas com 1.000 e 2.000 células. Novamente foram observados esferoides menos íntegros com espalhamento de células individuais e pequenos aglomerados nos cultivos iniciados com 4.000 e 8.000 células no tempo de 240 horas de cultivo.

O processo de esferoidização nas primeiras horas de cultivo, que envolve principalmente as interações entre as E-caderinas da membrana celular (LIN *et al*., 2006; SMYREK *et al*., 2019) e leva à formação de esferoides com maior grau de compactação, parece ter ocorrido de maneira menos eficiente nos cultivos 3D das células primárias quando comparadas aos cultivos 3D da linhagem RT4. Apesar de serem provenientes do mesmo tipo de câncer, as células BL0293 e BL0808 se comportaram de maneira diferente das RT4 e não demonstraram capacidade de se

agregar espontaneamente, como observado na Figura 25A. Muito provavelmente, houve ou baixa produção de MEC nas culturas dos esferoides BL0293 e BL0808 (como fibronectina) ou baixa expressão de genes relacionados à interação célula-célula (GENCOGLU *et al*., 2018). A suplementação do meio de cultura com 5% de Matrigel auxiliou a agregação, mas não garantiu a estabilidade dos esferoides ao longo do tempo, papel desempenhado, por sua vez, pela interação das proteínas do citoesqueleto com as proteínas presentes na MEC secretada (SART *et al*., 2014). Como consequência, foi observado o espalhamento das células ao longo do cultivo. Como discutido anteriormente, optou-se pela suplementação de uma baixa concentração de Matrigel nas culturas dos esferoides BL0293 e BL0808 para não limitar o tamanho desses esferoides, como foi observado nas culturas RT4 embebidas em 50% de Matrigel. Um aumento da concentração de Matrigel talvez pudesse levar a um aumento na agregação e possível compactação dos esferoides BL0293 e BL0808, no entanto, é importante destacar que o processo de formação e compactação dos esferoides não se limita a um simples aumento de viscosidade, sendo importantes outras características macromoleculares, como demonstrado nos trabalhos de Leung *et al*. (2015) com diferentes tipos celulares.

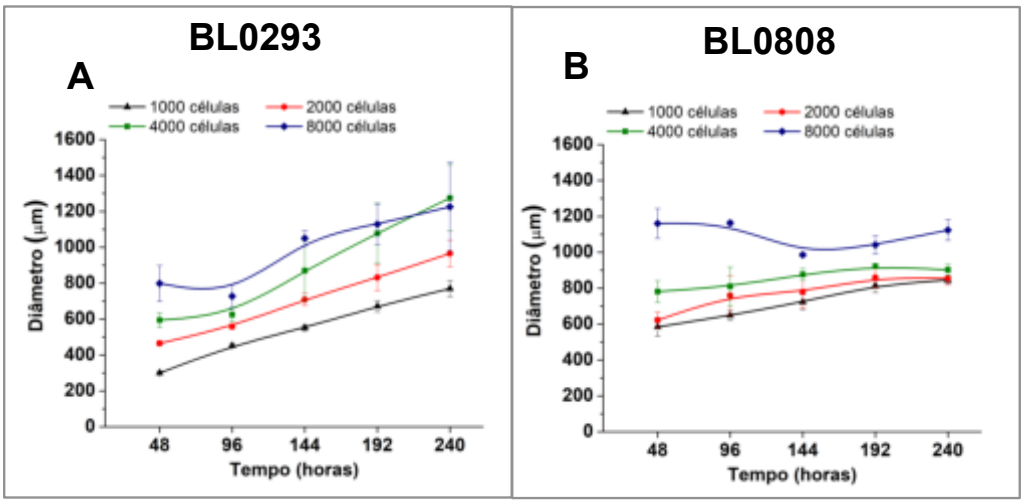
5.2.2 Caracterização dos cultivos 3D BL0293 e BL0808

Os esferoides BL0293 e BL080 gerados foram caracterizados quanto aos parâmetros morfológicos (tamanho e forma), de crescimento e organização celular para que fosse possível selecionar as melhores condições (tempo e número de células) a serem utilizadas nos ensaios de resposta aos fármacos antineoplásicos.

5.2.2.1 Tamanho e parâmetros de forma

Os diâmetros médios dos esferoides BL0293 plaqueados com 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 células/poço variaram de 321 ± 20 a 770 ± 44 µm, 451 ± 64 a 966 ± 74, 631 ± 17,51 a 1274 ± 183,73 e 960 ± 154 a 1225 ± 250 µm, respectivamente, representando uma variação de 2,39; 2,14; 2,02 e 1,27 vezes (Figura 33A).

Figura 33. Diâmetro dos esferoides BL0293 e BL0808 ao longo de 240 horas de cultivo



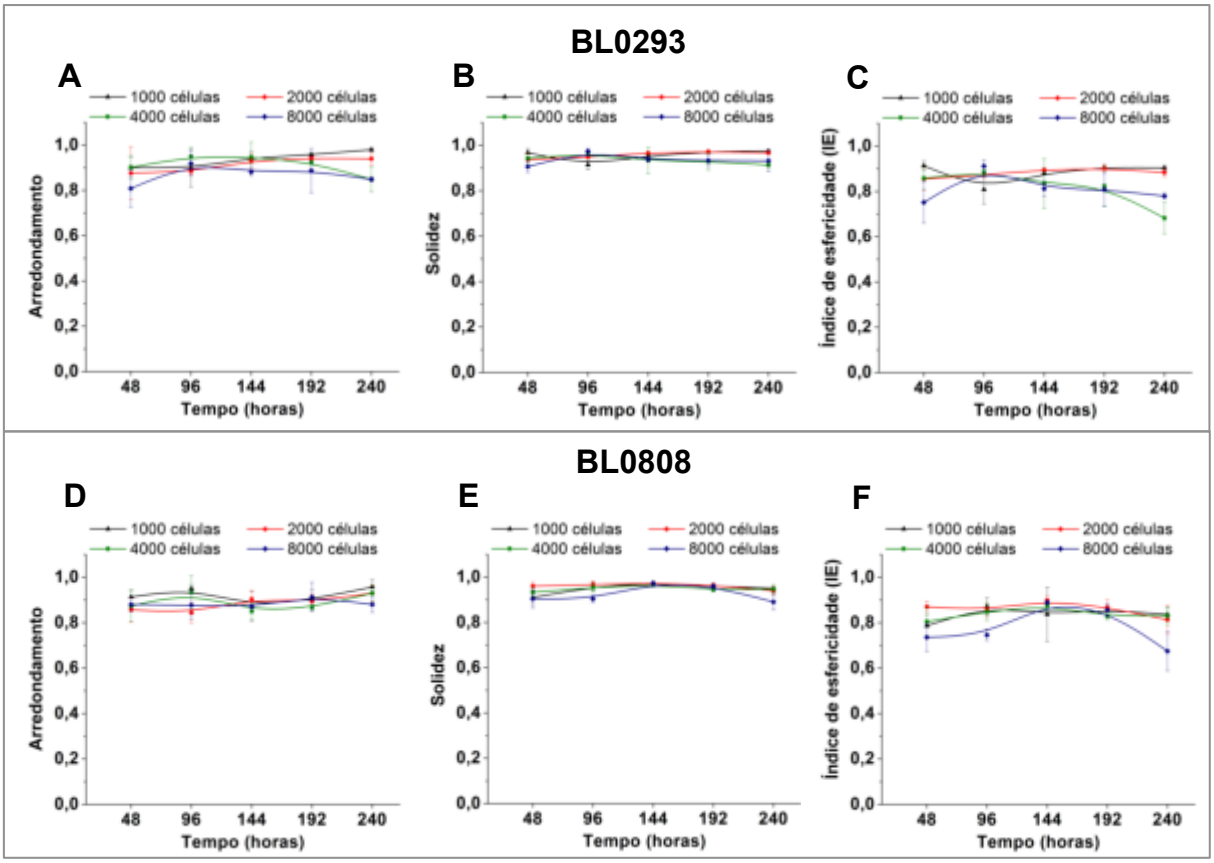
(A): esferoides BL0293. (B): esferoides BL0808. Diâmetro de Ferret calculado pelo *software* ImageJ. Dados apresentados como a média dos diâmetros ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

Já os esferoides BL0808 iniciaram os cultivos com um diâmetro médio maior em comparação com os esferoides BL0293, possivelmente devido ao menor grau aparente de compactação (Figura 33B). No entanto, os esferoides BL0808 apresentaram variações menores de diâmetro ao longo do cultivo (inferiores a 1,77 vezes) em todas as condições analisadas, iniciando com 477 ± 30, 548 ± 12, 788 ± 90 e 1077 ± 33 µm e finalizando com 846 ± 22, 855 ± 36, 902 ± 31 e 1124 ± 58 µm, nas culturas iniciadas com 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 células/poço, respectivamente.

Foram considerados como melhores resultados os esferoides produzidos com número inicial de 1.000 células/poço, uma vez que atendem aos requisitos de tamanho (faixa de 300 a 500 µm) relatados na literatura (IVANOV *et al*., 2014; PATRA *et al*., 2016; WAN *et al*., 2016; VOISSIERE *et al*., 2017). Os esferoides do tumor devem ser grandes o suficiente para permitir o gradiente químico e pequenos o suficiente para não desenvolver aberrações, como um núcleo necrótico secundário, que pode afetar a precisão do teste de eficácia do medicamento (RIFFLE & HEGDE, 2017).

Os resultados quanto aos parâmetros de forma foram apresentados na figura 29.

Figura 34. Parâmetros de forma dos esferoides BL0293 e BL0808 ao longo de 240 horas de cultivo



(A – C): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides BL0293. (B): arredondamento, solidez e índice de esfericidade, respectivamente, dos esferoides BL0808. Os parâmetros foram calculados pelo *software* ImageJ. Dados apresentados como a média dos parâmetros ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

Apesar do aparente baixo grau de compactação, os valores de arredondamento (quanto a área projetada se aproxima de um círculo matematicamente perfeito) foram superiores a 0,80 em ambos os cultivos, BL0293 e BL0808 (Figura 34A e D). As culturas de células BL0293 iniciadas com 1.000 e 2.000 células/poço mantiveram os valores de arredondamento superiores a 0,90 a partir de 96 horas de cultivo e apresentaram os maiores valores no fim de 240 horas de cultivo: 0,97 ± 0,0 e de 0,93 ± 0,02, respectivamente. Nas culturas com BL0808, o maior valor atingido ao final de 240 horas foi de 0,95 ± 0,03 nas culturas iniciadas com 1.000 células/poço. As culturas iniciadas com 2.000 e 4.000 células/poço também alcançaram valores superiores a 0,90 ao fim do cultivo.

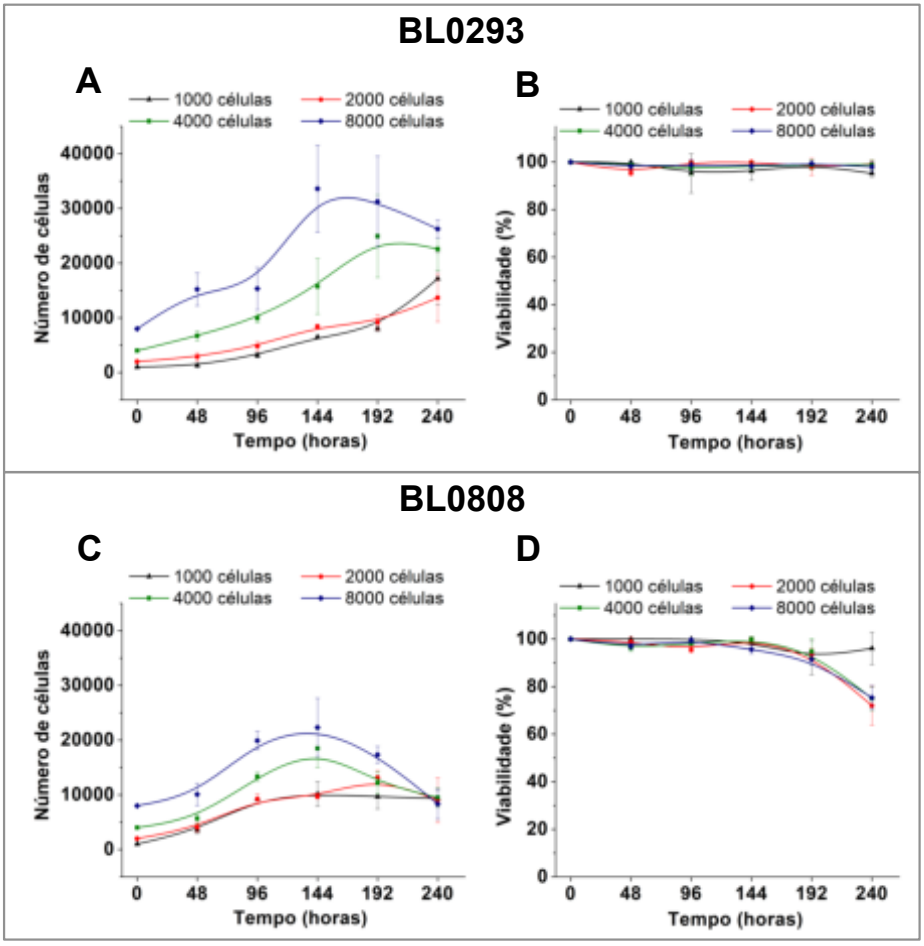
No caso do parâmetro solidez, ambos os cultivos 3D geraram esferoides com valores superiores a 0,90 ao longo das 240 horas de cultivo (Figura 34B e E). Os

menores valores no final do experimento foram registrados para as culturas BL0293 com 4.000 e 8.000 células/poço iniciais, 0,91 ± 0,01 e 0,93 ± 0,04, e para as culturas BL0808 com 8.000 células/poço iniciais, 0,90 ± 0,03. O último parâmetro analisado, o índice de esfericidade (IE), apresentou menores oscilações nos valores médios nas culturas iniciadas com 1.000 e 2.000 células/poço com ambas as células (Figura 34C e F). Nas culturas BL0293, valores superiores a 0,90, indicando aproximação de uma forma esférica, foram registrados apenas nos cultivos iniciados com 1.000 e 2.000 células/poço após 168 horas de cultivo. Os cultivos iniciados com 4.000 e 8.000 células/poço não apresentaram valores de IE superiores a 0,90 durante todo o cultivo, chegando a valores de 0,68 ± 0,07 e 0,78 ± 0,01, o que indica a formação de agregados de forma mais elipsoide. Já nas culturas 3D com células BL0808, os esferoides formados com 1.000, 2.000 e 4.000 células/poço foram os que apresentaram valores de IE mais próximos a 0,90, no entanto, em nenhuma condição foram registrados valores de IE superiores a 0,90. Esferoides que apresentam formas não esféricas ou irregulares, além de baixos valores de solidez e arredondamento, são considerados mais instáveis e passíveis de apresentarem maior variabilidade nos ensaios realizados (THOMA *et al*., 2014; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015; ZANONI *et al*., 2016).

5.2.2.2 Crescimento e viabilidade celular

Em todas as condições dos cultivos de esferoides BL0293, foi observado aumento no número de células, sendo um indicativo da presença de células em estado proliferativo (Figura 35A). O fator de expansão foi de 17,16; 6,83; 6,80 e 4,76 vezes nas culturas iniciadas com 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 células/poço, respectivamente. Somente as culturas iniciadas com 4.000 e 8.000 células/poço apresentaram um declínio no número de células a partir de 192 e 144 horas, respectivamente. O maior número de células alcançado, 26.250 ± 1.639,36, foi em 144 horas nas culturas iniciadas com 8.000 células/poço. A viabilidade manteve-se acima de 90% durante todo o experimento em todas as condições. Esse dado pode corroborar a hipótese de que as células que se espalharam ao redor dos esferoides com maior número de células (observadas nas Figuras 26 e 27) não são células mortas, mas, possivelmente, resultado de uma perda de estabilidade estrutural em decorrência de uma baixa compactação.

Figura 35. Crescimento e viabilidade das células BL0293 e BL0808 nos cultivos 3D ao longo de 240 horas



(A, B): crescimento e viabilidade celular, respectivamente, dos esferoides BL0293. (C, D): crescimento e viabilidade celular, respectivamente, dos esferoides BL0808. Número de células calculado por meio de contagem em câmara de Neubauer. Viabilidade calculada por meio do método de exclusão por Azul de Tripan. Dados apresentados como a média do número de células ou viabilidade ± desvio-padrão (n=3).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

Nas culturas 3D BL0808, o fator de expansão foi de 11,5; 6,66; 4,62 e 3,0 vezes nos cultivos iniciados com 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 células/poço, respectivamente (Figura 35B). O número máximo de células atingido durante o cultivo foi menor do que nos cultivos BL0293 (18.500 ± 3.500 e 22.333 ± 5.346 células em 144 horas nos cultivos iniciados com 4.000 e 8.000 células/poços, respectivamente). Após atingir esses valores, o número de células decresceu em ambas as culturas. Não foi observada a fase de declínio nos cultivos iniciados com 1.000 células/poço. Até 144 horas de cultivo, os valores de viabilidade celular em todas as culturas ficaram acima dos 90%. Após esse período, as viabilidades dos

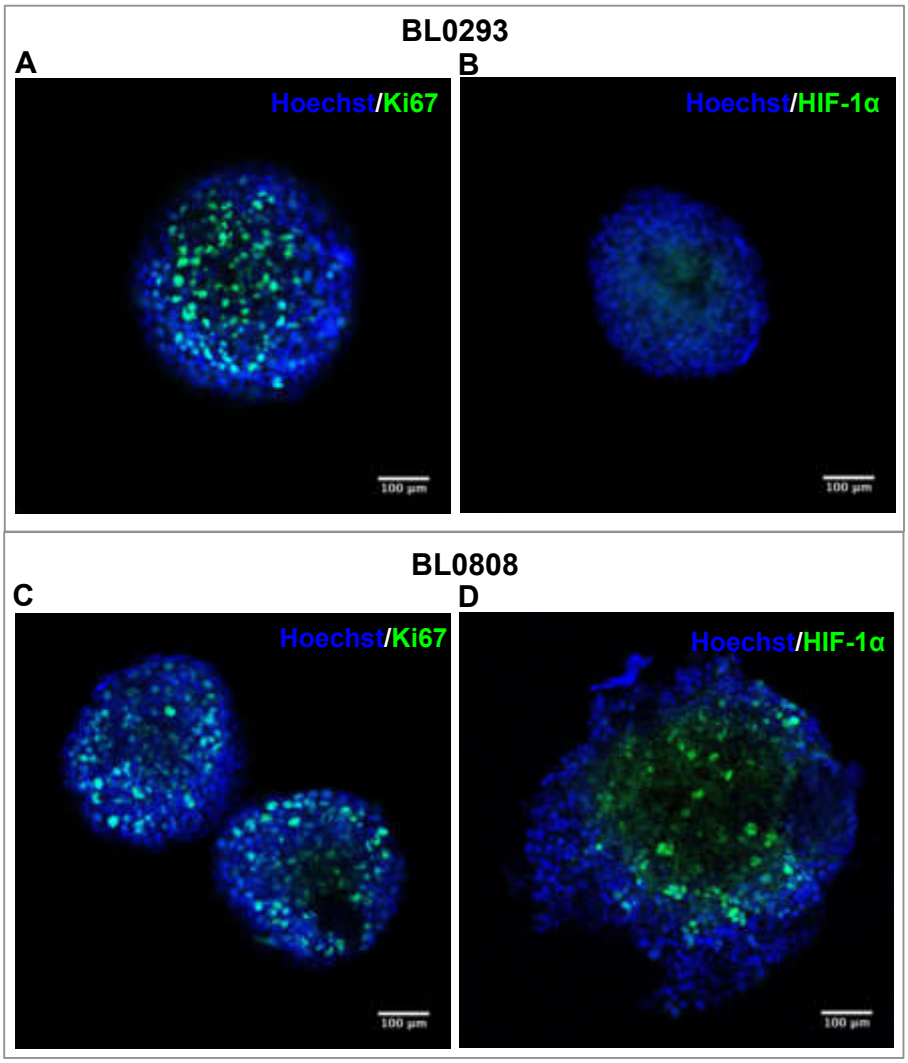
cultivos com 2.000, 4.000 e 8.000 células/poço caíram para 72,00 ± 8,18; 75,00 ± 5,00 e 75,33 ± 5,03%.

As culturas 3D com células tanto BL0293 quanto BL0808 iniciadas com menor número de células/poço, 1.000 e 2.000, geraram esferoides com características morfológicas consideradas na literatura como adequadas para serem aplicadas em modelos *in vitro* de seleção de fármacos (LEUNG *et al*., 2015). Diante dos resultados, esferoides de 144 horas gerados nas culturas iniciadas com 1.000 células/poço foram escolhidos para a continuidade dos ensaios.

5.2.2.3 Presença de células proliferativas e hipóxicas

Os esferoides BL0293 e BL0808 foram avaliados quanto à presença e distribuição de células proliferativas e em hipóxia (Figura 36). A presença de células proliferativas nos esferoides BL0293 e BL0808 foi confirmada através da imunomarcação fluorescente com o anticorpo primário anti-Ki67 humano conjugado ao anticorpo secundário FITC, que garante a marcação verde fluorescente (Figura 36A, C). A proteína Ki-67 encontra-se presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0 (interfase), sendo um importante parâmetro histopatológico clínico (fração de células Ki-67 positivas em relação às negativas) (WIESNER *et al*., 2009). A presença de células Ki-67 em PDSs, por exemplo, pode indicar a manutenção do potencial proliferativo dessas células (ZHANG & TANG, 2018). Muitos trabalhos mostram que as células proliferativas concentram-se nas camadas mais externas do tumoral sólido (maior disponibilidade de oxigênio e nutriente), no entanto, a localização dessas células proliferativas pode estar associada ao tamanho dos esferoides. Riffle *et al*. (2017) mostraram com esferoides de sarcoma de Ewing que células Ki-67 positivas foram encontradas por todo o esferoide, inclusive na regiões interiores, quando este possuía por volta de 400 µm, como também foi observado nos esferoides BL0293 e BL0808 (diâmetros na faixa entre 400 e 500 µm). As células Ki-67 positivas restritas à camada superficial apenas foram observadas por eles nos esferoides com tamanho superior a 500 µm, formando uma camada de até 80 µm de espessura (RIFFLE *et al*., 2017). PDSs de tumor de bexiga gerados por Gheibi *et al*. (2017) apresentam perfil semelhante de distribuição de células Ki67 positivas em esferoides com altos e baixos valores de diâmetro.

Figura 36. Imunomarcação fluorescente dos esferoides BL0293 e BL0808 após 144 horas de cultivo



Anticorpo secundário FITC utilizado para detecção fluorescente (marcação esverdeada) dos anticorpos primários anti-HIF-1 α e anti-Ki67. Núcleos celulares marcados com Hoechst (marcação azulada). (A, B): esferoides BL0293 marcados para as proteínas HIF-1 α e Ki67, respectivamente. (C, D): esferoides BL0808 marcados para as proteínas HIF-1 α e Ki67, respectivamente. Microscopia confocal fluorescente, aumento de 20X, barra de escala = 100 μ m.
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

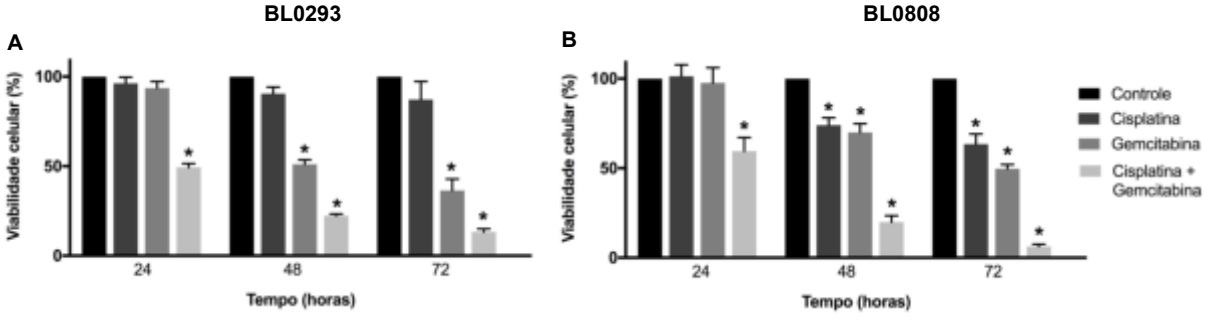
Os esferoides BL0293 e BL0808 também foram submetidos à marcação com anticorpo primário anti-HIF-1α, conjugado com anticorpo secundário FITC, para identificação de células em hipóxia (Figura 36B, D). Nos esferoides BL0293 de 144 horas, foi possível observar células marcadas para HIF-1α concentradas em uma pequena região interna (Figura 36A). Um perfil de coloração semelhante foi observado em esferoides gerados com linhagens celulares de câncer de bexiga (RINGUETTE-GOULET *et al*., 2017). De acordo com as imagens de microscopia

confocal, a quantidade de células HIF-1α positivas parece ser maior no esferoide BL0808, que, por sua vez, possui maior tamanho (Figura 33B). O aumento do núcleo hipóxico proporcionalmente ao tamanho do esferoide é relatado na literatura (DASTER *et al*., 2017). Como discutido anteriormente, a difusão diferencial de nutrientes e gases pelas camadas que compõem os esferoides é de extrema importância na mimetização de diversas propriedades observadas nos tumores sólidos *in vivo*, como a indução da expressão de VEGF-A, Glut1 e CA-IX (do inglês, *Carbonic anhydrase IX*), que promovem a angiogênese (LOBODA; JOZKOWICZ; DULAK, 2010) e também estão associados à sobrevivência celular através da regulação da reprogramação metabólica e repressão da sinalização e proliferação pró-apoptótica (LEEK *et al*., 2016).

5.2.3 Avaliação da sensibilidade dos cultivos 3D e modelos PDX BL0293 e BL0808 à Cisplatina e Gemcitabina

Os esferoides BL0293 e BL0808 cultivados por 144 horas em culturas iniciadas com 1.000 células/poço foram tratados com 10 μM dos fármacos antineoplásicos Cisplatina, Gemcitabina, e a combinação de ambos por 24, 48 ou 72 horas de acordo com o estabelecido no trabalho de Gheibi *et al*. (2017) (Figura 37).

Figura 37. Viabilidade celular dos esferoides BL0293 e BL0808 após tratamento com Cisplatina e Gemcitabina por 24, 48 e 72 horas

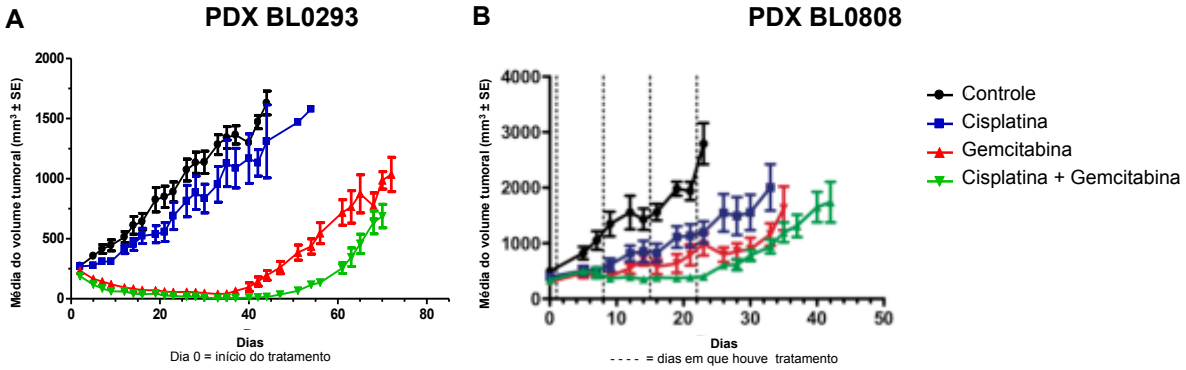


Concentração dos fármacos: 10 μM. Tempo de incubação: 24, 48 e 72 horas. Controle: esferoides cultivados em meio de cultura RPMI padrão. (A): os esferoides BL0293 foram gerados com número inicial de 1.000 células/poço e cultivados por 144 horas antes do início do tratamento. (B): os esferoides BL0808 foram gerados com número inicial de 1.000 células/poço e cultivados por 144 horas antes do início do tratamento. A viabilidade celular foi determinada indiretamente por meio de quantificação de ATP utilizando 3D CellTiter-Glo (Promega). Teste estatístico para amostras não pareadas t de *student* ($p<0,01$). Dados apresentados como a média da viabilidade celular ± desvio-padrão (n=2).
Fonte: modificado de Amaral *et al*. (2020).

A viabilidade celular dos esferoides BL0293 diminuiu 50% após 24 horas de tratamento com a combinação de Cisplatina e Gemcitabina (Figura 37A). Após 48 e 72 horas, as viabilidades decresceram para os valores de 22,3 ± 1,7 e 13,3 ± 2,8%, respectivamente. Também foi observada maior sensibilidade dos esferoides ao tratamento com Gemcitabina, que diminuiu a viabilidade celular para 36,5 ± 11,1% após 72 horas de exposição. Não foi observada diferença estatística entre o controle e os esferoides tratados com Cisplatina. Com esses resultados, concluímos que os esferoides BL0293 PDX foram sensíveis à Gemcitabina e à combinação de Cisplatina e Gemcitabina, mas foram resistentes à Cisplatina.

Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios *in vivo* utilizando os modelos PDX BL0293, como observado na Figura 38A, previamente publicada por Pan *et al*. (2015).

Figura 38. Alteração no volume dos tumores dos modelos *in vivo* PDX após tratamento com Cisplatina e Gemcitabina



Os camundongos foram aleatoriamente designados para os grupos de tratamento (6 por grupo). O tratamento se iniciou quando os tumores atingiram volumes de aproximadamente 250 a 500 mm^3. Grupo 1 (controle/linha preta): camundongos não tratados com os antineoplásicos. Grupo 2 (linha azulada): camundongos tratados intravenosamente com 2 mg/kg de Cisplatina (3 doses a cada 7 dias). Grupo 3 (linha avermelhada): camundongos tratados com 150 mg/kg de Gemcitabina (4 doses a cada 7 dias). Grupo 4 (linha esverdeada): camundongos tratados com Cisplatina e Gemcitabina. (A): camundongos PDX BL0293. (B): camundongos PDX BL0808. O tamanho do tumor foi determinado por uma pinça, e o volume pela fórmula: ½ × comprimento × $largura^2$. Os dados foram apresentados como média do volume do tumor ± desvio-padrão (n=6).
Fonte (A): Pan *et al*. (2015).
Fonte (B): dados não publicados, cordialmente cedidos pela Dra. Maike Zimmermann.

O modelo PDX BL0293 foi gerado com tumor de bexiga avançado de paciente que não recebeu tratamento anterior à cirurgia, e também foi mais sensível à combinação dos quimioterápicos e à Gemcitabina do que as doses individuais de Cisplatina. Por 40 dias, os grupos tratados com Gemcitabina e a combinação dos fármacos apresentaram volumes médios de massa tumoral próximos a zero. Quanto

à Cisplatina, os tumores do PDX BL0293 parecem possuir uma resistência intrínseca à ação desse fármaco. O aumento no volume do tumor após esse período nesses grupos pode estar associado ao desenvolvimento de resistência (adquirida) dos tumores, fenômeno que é usualmente observado também nos pacientes em tratamento.

Os esferoides BL0808 também foram mais sensíveis à combinação de Cisplatina e Gemcitabina, e mostraram viabilidade celular de 59,5 ± 13,2; 20,0 ± 6,2 e 6,8 ± 1,4% após 24, 48 e 72 horas de exposição (Figura 37B). Nas primeiras 24 horas de tratamento, não foi observada diferença estatística entre os esferoides do grupo controle, sem tratamento, e os tratados com Cisplatina ou Gemcitabina separadamente. A viabilidade dos esferoides tratados com Cisplatina diminuiu para 74,0 ± 7,2 e 63,5 ± 9,6% após 48 e 72 horas, mostrando uma sensibilidade parcial dos esferoides BL0808 a esse fármaco. Também foram parcialmente sensíveis à Gemcitabina após 48 e 72 horas de tratamento, apresentando viabilidade celular de 70,0 ± 8,4 e 49,7 ± 4,0%.

Esses resultados também se assemelharam aos dados obtidos *in vivo* com o modelo PDX BL0808 (Figura 38B). O PDX BL0808 foi estabelecido a partir de amostra de câncer de bexiga avançado de paciente que foi tratado anteriormente à cirurgia com Gemcitabina e Cisplatina (neoadjuvância). Novamente, houve maior sensibilidade dos tumores ao tratamento com combinação de Cisplatina e Gemcitabina. Apesar de o volume médio dos tumores não ter decrescido, como nos modelos BL0293, ele se manteve constante ao longo de 20 dias de tratamento com valores abaixo dos tumores do grupo controle. Os tumores dos grupos tratados com Cisplatina ou Gemcitabina, separadamente, apresentaram aumento no volume médio do tumor, porém, novamente, esses valores ficaram abaixo dos tumores do grupo controle, mostrando uma sensibilidade parcial aos tratamentos. Bjersand *et al*. (2015) mostraram que os modelos PDX tendem, de fato, a reproduzir a resistência que foi adquirida pelas células tumorais durante o tratamento neoadjuvante do paciente.

A menor sensibilidade dos esferoides e tumores nos modelos *in vivo* à Cisplatina, um agente prejudicial ao DNA, pode estar associada a uma maior expressão dos genes *NER* (do inglês *nucleotide excision repair*), comumente observada em células de câncer de ovário, glioma, bexiga e pulmão (WU *et al*., 2003). A Gemcitabina, por sua vez, incorpora-se ao DNA, diminuindo a expressão

de duas proteínas-chave do sistema NER: ERCC-1 (do inglês, *excision repair cross-complementation group 1*) e XP-A (do inglês, *xeroderma pigmentosum complementation group A*) (YANG *et al*., 2000). Assim, quando usada em combinação, a inibição do sistema NER pela Gemcitabina aumenta a formação de adutos de platina no DNA pela Cisplatina (ZHANG *et al*., 2015). A combinação de Cisplatina e Gemcitabina é comumente usada como quimioterapia de primeira linha no câncer de bexiga avançado devido à atividade antineoplásica sinérgica (VALLE *et al*., 2015). Essa atividade antineoplásica sinérgica também foi relatada em esferoides formados por células de neuroblastoma (BESANÇON *et al*., 2012). Mesmo passando pelo cultivo em monocamada após dissociação dos fragmentos tumorais e antes da geração dos esferoides, as células mantiveram o perfil de resposta observado nos modelos *in vivo.*

Outros trabalhos recentes lançaram mão da técnica de formação de esferoides a partir de células provenientes de tumores expandidos em modelos PDX de câncer de bexiga (GHEIBI *et al*., 2017), mama (THEODORAKI *et al*., 2015) e fígado (SONG *et al*., 2018). Ao realizarem ensaios de sensibilidade com esses esferoides *in vitro*, os autores também observaram respostas semelhantes às obtidas em ensaios realizados com os modelos PDX, de onde as células se originaram. Esses dados possibilitam inferir que as células tumorais mantiveram nos esferoides *in vitro* as mesmas características fisiopatológicas observadas *in vivo*, confirmando a possibilidade da aplicação dos esferoides como modelos *in vitro* com boa capacidade preditiva para seleção de compostos.

A otimização dessas técnicas de cultura 3D abre caminho para o desenvolvimento de cultivos gerados com células obtidas diretamente de pacientes com câncer de bexiga. Os tratamentos personalizados em oncologia surgiram nos últimos anos devido a melhorias na caracterização molecular e nas técnicas de perfil farmacogenético (FRIEDMAND *et al*., 2015), no entanto, vários estudos mostraram que, em muitos casos, a detecção de mutações tumorais não confirma necessariamente a eficácia da terapia (VOEST & BERNARDS, 2016). Por exemplo, em um estudo de Pauli *et al*. (2017), foi relatado que apenas 0,4% das alterações somáticas das células cancerígenas são alvos para a quimioterapia aprovada pela FDA. Os ensaios funcionais feitos em células tumorais derivadas de pacientes cultivadas em sistemas 3D podem fornecer uma análise mais precisa do que qualquer abordagem baseada apenas em “omicas” (LEE *et al*., 2018a). Da mesma

forma, estudos recentes relataram correlação positiva entre a resposta de um paciente ao tratamento e resultados obtidos em ensaios pré-clínicos usando células derivadas do próprio paciente mantidas em culturas 3D (WEEBER *et al*., 2017; VLACHOGIANNIS *et al*., 2018).

6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho, voltada à comparação de técnicas de cultivo 3D utilizando a linhagem celular RT4, conclui-se que:

- As técnicas de flutuação forçada (ULA), gota suspensa (HD), e os cultivos utilizando os suportes Matrigel e HydroMatrix geraram com sucesso esferoides RT4 compactos, regulares, com geometria elíptica/esférica e contornos arredondados.
- Nos sistemas de cultivo livres de suporte, o tempo de esferoidização foi de 48 horas, com a formação de um único esferoide por poço com diâmetro entre 200 e 600 µm, dependendo do número inicial de células e tempo de cultivo. Além disso, os esferoides apresentaram crescimento celular inferior ao observado nos cultivos 2D e, por consequência, um perfil metabólico também reduzido.
- Nos sistemas de cultivo dependentes de suporte, o tempo de esferoidização foi de 96 horas, com a formação de vários esferoides por poço sem uniformidade de diâmetro e forma. Não foram formados esferoides com diâmetros superiores a 200 µm de diâmetro.
- Os esferoides RT4 em Matrigel apresentaram crescimento celular e perfil metabólico superiores aos observados nos cultivos 2D. Já os esferoides RT4 em HydroMatrix apresentaram crescimento celular e perfil metabólico próximos aos observados nos cultivos 2D.
- Dentre os sistemas de cultivo livres de suporte, a técnica de flutuação forçada foi considerada a mais adequada devido às características dos esferoides formados e aos aspectos técnicos. Dentre os sistemas de cultivo dependentes de suporte, os esferoides RT4 em Matrigel foram considerados os mais adequados, devido também às características dos esferoides formados e à menor variação de tamanho e forma destes quando produzidos em uma mesma condição.
- Os esferoides RT4 gerados em ULA foram menos sensíveis ao tratamento com DOX quando comparados aos cultivos 2D. Já os esferoides formados em Matrigel apresentaram comportamento semelhante ao observado nos cultivos 2D.
- Os esferoides RT4 em ULA apresentaram maior expressão dos genes *ALDH1A1* e *H-RAS* em relação aos cultivos 2D. A superexpressão desses

genes tem sido relacionada como um dos principais mecanismos de resistência e reincidência de tumores de bexiga.

- Os esferoides RT4 em Matrigel apresentaram maior expressão da maioria dos genes analisados (*HIF-1α, IFIT5, MDR-1, IL3, ALDH1A1 e H-RAS*) em relação aos cultivos 2D, indicando melhor recapitulação do perfil de expressão gênica observado no tumor *in vivo.*

Com base nos resultados obtidos na segunda etapa deste trabalho com os cultivos 3D de células primárias de tumor de bexiga humano derivadas de modelos PDX, conclui-se que:

- A técnica de cultivo utilizando microplacas ULA e 5% de Matrigel gerou com sucesso esferoides BL0293 e BL0808 esféricos, com superfície regular e contorno arredondado.
- Os esferoides BL0293 apresentaram diâmetros que variaram de 200 a 1.200 µm e altos fatores de expansão.
- Os esferoides BL0808 apresentaram diâmetros que variaram de 600 a 1200 µm e fatores de expansão relativamente menores.
- Ambos os esferoides foram marcados positivamente para a presença de células proliferativas e em hipóxia.
- Os perfis de sensibilidade dos esferoides BL0293 e BL0808 à Cisplatina e à Gemcitabina foram semelhantes aos obtidos previamente nos ensaios *in vivo* com os modelos PDX BL0293 e BL0808.

De maneira geral, foi possível concluir com este trabalho que a técnica de gota suspensa em placas ULA e o cultivo utilizando o suporte Matrigel foram capazes de recapitular *in vitro* características do tumor *in vivo*, podendo ser considerados promissores modelos 3D de câncer de bexiga.

7. Trabalhos Futuros

Este trabalho estabeleceu modelos 3D de câncer de bexiga tendo como um dos focos a utilização de técnicas de cultivo 3D simples, de baixo custo, reprodutíveis e aplicadas em plataformas de triagem de alto desempenho. A simples mimetização de uma organização celular em um microambiente 3D é suficiente para recapitular muitas características dos tumores sólidos, do que as culturas em monocamada são incapazes. No entanto, a complexidade do microambiente tumoral vai muito além da organização das células tumorais em esferoides. Por isso, fazem-se cada vez mais necessárias pesquisas que visem ao aperfeiçoamento desses modelos 3D. Por exemplo, a heterogeneidade dos tumores de bexiga é tida hoje como a principal causa da resistência desses tumores aos tratamentos vigentes, o que, por consequência, leva a inúmeros casos de recidiva desses tumores. Nesse contexto, o uso de sistemas microfluídicos pode aumentar o tempo de cultivo *in vitro* de esferoides de bexiga, possibilitando a observação a longo prazo do desenvolvimento de possíveis mecanismos de resistência oriundos de alterações genotípicas e fenotípicas em resposta a longos períodos de tratamento.

Outra abordagem bastante interessante para os modelos de esferoides de tumor de bexiga é o cocultivo destes com células do estroma tumoral, como fibroblastos e células do sistema imune. A interação de células estromais com as células tumorais bem como a produção de citocinas por essas células podem levar à recapitulação da plasticidade tumoral. A presença de uma subpopulação de células-tronco tumorais tem sido o foco hoje de muitos estudos que buscam novos alvos para desenvolvimentos de terapias. Além disso, o cocultivo de células tumorais com células do sistema imune gera modelos *in vitro* pré-clínicos que poderão ser aplicados nos ensaios de seleção de potenciais fármacos para o uso em imunoterapia, tida hoje como um dos mais promissores tratamentos para vários tipos de câncer. A mimetização mais fidedigna desse microambiente tumoral permitirá também a otimização do estabelecimento do cultivo de organoides com células tumorais derivadas diretamente de pacientes, técnica que ainda enfrenta limitações considerando os modelos vigentes, mas que vai ao encontro das novas tendências da oncologia personalizada.

Por fim, o estabelecimento de modelos pré-clínicos *in vitro* cada vez mais complexos e preditivos tem como resultado não só a redução de custo e tempo dos processos de triagem de compostos, como também a diminuição do uso de animais em pesquisa. Pesquisadores adeptos ao uso de modelos alternativos aos animais

na pesquisa acadêmica e na indústria acreditam que, no futuro, os modelos *in vitro* terão uma capacidade preditiva tão alta que poderão substituir totalmente modelos *in vivo* em áreas como a oncologia, como já acontece na cosmetologia.

8. Referências

AMELIAN, A.; WASILEWSKA, K.; MEGIAS, D.; WINNICKA K. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. **Pharmacological Reports**, vol. 69, no. 5, p. 861–870, 2017. DOI 10.1016/j.pharep.2017.03.014

ABACI, H. E.; GUO, Z.; DOUCET, Y.; JACKÓW, J.; CHRISTIANO, A. Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development. **Experimental Biology and Medicine**, vol. 242, no. 17, p. 1657–1668, 2017. DOI 10.1177/1535370217712690.

ABBOTT, A. Cell culture: Biology's new dimension. **Nature**, vol. 424, no. 8, p. 870–872, 2003. DOI 10.1038/424870a.

ABOULKHEYR ES, H.; MONTAZERI, L.; AREF, A. R.; VOSOUGH, M.; BAHARVAND, H. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. **Trends in Biotechnology**, vol. 36, no. 4, p. 358–371, 2018. DOI 10.1016/j.tibtech.2017.12.005.

ACHILLI, T. M.; MEYER, J.; MORGAN, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert Opinion on Biological Therapy**, vol. 12, no. 10, p. 1347–1360, 2012. DOI 10.1517/14712598.2012.707181.

ADCOCK, A. F. Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, vol. 06, no. 03, 2015. DOI 10.4172/2155-9872.1000249.

AFRIMZON, E.; BOTCHKINA, G.; ZURGIL, N.; SHAFRAN, Y.; SOBOLEV, M.; MOSHKOV, S.; RAVID-HERMESH, O.; OJIMA, I.; DEUTSCH, M. Hydrogel microstructure live-cell array for multiplexed analyses of cancer stem cells, tumor heterogeneity and differential drug response at single-element resolution. **Lab on a Chip**, vol. 16, no. 6, p. 1047–1062, 2016. DOI 10.1039/c6lc00014b.

AHONEN, I.; ÅKERFELT, M.; TORISEVA, M.; OSWALD, E.; SCHÜLER, J.; NEES, M. A high-content image analysis approach for quantitative measurements of chemosensitivity in patient-derived tumor microtissues. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-06544-x.

ALBRITTON, J. L.; MILLER, J. S. 3D bioprinting: Improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments. **DMM Disease Models and Mechanisms**, vol. 10, no. 1, p. 3–14, 2017. DOI 10.1242/dmm.025049.

ALCANTARA WARREN, C.; DESTURA, R. V.; SEVILLEJA, J. E. A. D.; BARROSO, L. F.; CARVALHO, H.; BARRETT, L. J.; O'BRIEN, A. D.; GUERRANT, R. L. Detection of Epithelial-Cell Injury, and Quantification of Infection, in the HCT-8 Organoid Model of Cryptosporidiosis. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 198, no. 1, p. 143–149, 2008. DOI 10.1086/588819.

ALCARAZ, J.; NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Biomechanical approaches for studying integration of tissue structure and function in mammary epithelia. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, vol. 9, no. 4, p. 361–374, 2004. DOI 10.1007/s10911-004-1406-8.

ALEMANY-RIBES, M.; SEMINO, C. E. Bioengineering 3D environments for cancer models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 79, p. 40–49, 2014. DOI 10.1016/j.addr.2014.06.004.

ALÉPÉE, N.; BAHINSKI, A.; DANESHIAN, M.; DE WEVER, B.; FRITSCHE, E.; GOLDBERG, A.; HANSMANN, J.; HARTUNG, T.; HAYCOCK, J.; HOGBERG, H. T.; HOELTING, L.; KELM, J. M.; KADEREIT, S.; MCVEY, E.; LANDSIEDEL, R.; LEIST, M.; LÜBBERSTEDT, M.; NOOR, F.; PELLEVOISIN, C.; … ZURICH, M. G. State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology. **Altex**, vol. 31, p. 441–477, 2014. DOI 10.14573/altex1406111.

ALHASAN, L.; QI, A.; AL-ABBOODI, A.; REZK, A.; CHAN, P. P. Y.; ILIESCU, C.; YEO, L. Y. Rapid Enhancement of Cellular Spheroid Assembly by Acoustically Driven Microcentrifugation. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 2, no. 6, p. 1013–1022, 2016. DOI 10.1021/acsbiomaterials.6b00144.

ALPAUGH, M. L.; TOMLINSON, J. S.; YE, Y.; BARSKY, S. H. Relationship of sialyl-Lewisx/a underexpression and E-cadherin overexpression in the lymphovascular embolus of inflammatory breast carcinoma. **American Journal of Pathology**, vol. 161, no. 2, p. 619–628, 2002. DOI 10.1016/S0002-9440(10)64217-4.

AMANN, A.; ZWIERZINA, M.; GAMERITH, G.; BITSCHE, M.; HUBER, J. M.; VOGEL, G. F.; BLUMER, M.; KOECK, S.; PECHRIGGL, E. J.; KELM, J. M.; HILBE, W.; ZWIERZINA, H. Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour - Stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 3, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0092511.

AMARAL, R. L. F.; MIRANDA, M.; MARCATO, P. D.; SWIECH, K. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. **Frontiers in Physiology**, vol. 8, no. AUG, 2017. DOI 10.3389/fphys.2017.00605.

AMARAL, R. L. F.; ZIMMERMANN, M.; MA, A. H.; ZHANG, H.; SWIECH, K.; PAN, C. X. A simple three-dimensional in vitro culture mimicking the in vivo-like cell behavior of bladder patient-derived xenograft models. Cancers, 12 (5), 1304, 2020. DOI 10.3390/cancers12051304.

ANADA, T.; FUKUDA, J.; SAI, Y.; SUZUKI, O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. **Biomaterials**, vol. 33, no. 33, p. 8430–8441, 2012. DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.08.040.

ANDERSEN, T.; AUK-EMBLEM, P.; DORNISH, M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. **Microarrays**, vol. 4, no. 2, p. 133–161, 2015. DOI 10.3390/microarrays4020133.

ANGELONI, V.; CONTESSI, N.; DE MARCO, C.; BERTOLDI, S.; TANZI, M. C.; DAIDONE, M. G.; FARÈ, S. Polyurethane foam scaffold as in vitro model for breast cancer bone metastasis. **Acta Biomaterialia**, vol. 63, p. 306–316, 2017. DOI 10.1016/j.actbio.2017.09.017.

ANTONI, S.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ZNAOR, A.; JEMAL, A.; BRAY, F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **European Urology**, vol. 71, no. 1, p. 96–108, 2017. DOI 10.1016/j.eururo.2016.06.010.

ARORA, S.; LAM, A. J. Y.; CHEUNG, C.; YIM, E. K. F.; TOH, Y. Determination of critical shear stress for maturation of human pluripotent stem cell-derived endothelial cells towards an arterial subtype. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 116, no. 5, p. 1164–1175, May 2019. DOI 10.1002/bit.26910.

ASGHAR, W.; EL ASSAL, R.; SHAFIEE, H.; PITTERI, S.; PAULMURUGAN, R.; DEMIRCI, U. Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. **Materials Today**, vol. 18, no. 10, p. 539–553, 2015. DOI 10.1016/j.mattod.2015.05.002.

AW YONG, K. M.; LI, Z.; MERAJVER, S. D.; FU, J. Tracking the tumor invasion front using long-term fluidic tumoroid culture. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-10874-1.

AXPE, E.; OYEN, M. L. Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, no. 12, 2016. DOI 10.3390/ijms17121976.

BABJUK, M.; BURGER, M.; ZIGEUNER, R.; SHARIAT, S. F.; VAN RHIJN, B. W. G.; COMPÉRAT, E.; SYLVESTER, R. J.; KAASINEN, E.; BÖHLE, A.; PALOU REDORTA, J.; ROUPRÊT, M. EAU guidelines on non-muscle-invasive Urothelial carcinoma of the bladder: Update 2013. **European Urology**, vol. 64, no. 4, p. 639–653, 2013. DOI 10.1016/j.eururo.2013.06.003.

BADROSSAMAY, M. R.; BALACHANDRAN, K.; CAPULLI, A. K.; GOLECKI, H. M.; AGARWAL, A.; GOSS, J. A.; KIM, H.; SHIN, K.; PARKER, K. K. Engineering hybrid polymer-protein super-aligned nanofibers via rotary jet spinning. **Biomaterials**, vol. 35, no. 10, p. 3188–3197, 2014. DOI 10.1016/j.biomaterials.2013.12.072.

BAEK, N.; SEO, O. W.; LEE, J.; HULME, J.; AN, S. S. A. Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. **Drug Design, Development and Therapy**, vol. 10, p. 2155–2165, 2016. DOI 10.2147/DDDT.S108004.

BAEVA, L. F.; LYLE, D. B.; RIOS, M.; LANGONE, J. J.; LIGHTFOOTE, M. M. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1β production. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, vol. 102, no. 2, p. 305–314, 2014. DOI 10.1002/jbm.a.34704.

BAI, C.; YANG, M.; FAN, Z.; LI, S.; GAO, T.; FANG, Z. Associations of chemo- and radio-resistant phenotypes with the gap junction, adhesion and extracellular matrix in a three-dimensional culture model of soft sarcoma. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, vol. 34, no. 1, 2015. DOI 10.1186/s13046-015-0175-0.

BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**, vol. 125, no. 13, p. 3015–3024, 2012. DOI 10.1242/jcs.079509.

BALDUS, S. E.; SCHAEFER, K. L.; ENGERS, R.; HARTLEB, D.; STOECKLEIN, N. H.; GABBERT, H. E. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. **Clinical Cancer Research**, vol. 16, no. 3, p. 790–799, 2010. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-2446.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, vol. 125, no. 23, p. 5591–5596, 2012. DOI 10.1242/jcs.116392.

BALTAZAR, F.; PINHEIRO, C.; MORAIS-SANTOS, F.; AZEVEDO-SILVA, J.; QUEIRÓS, O.; PRETO, A.; CASAL, M. Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response. **Histology and Histopathology**, vol. 29, no. 12, p. 1511–1524, 2014. DOI 10.14670/HH-29.1511.

BANKS, J. M.; HARLEY, B. A. C.; BAILEY, R. C. Tunable, Photoreactive Hydrogel System to Probe Synergies between Mechanical and Biomolecular Cues on Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Differentiation. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 1, no. 8, p. 718–725, 2015. DOI 10.1021/acsbiomaterials.5b00196.

BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A. B.; DEWHIRST, M. W.; BIGNER, D. D.; RICH, J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, vol. 444, no. 7120, p. 756–760, 2006. DOI 10.1038/nature05236.

BARBONE, D.; VAN DAM, L.; FOLLO, C.; JITHESH, P. V.; ZHANG, S. D.; RICHARDS, W. G.; BUENO, R.; FENNELL, D. A.; BROADDUS, V. C. Analysis of gene expression in 3D spheroids highlights a survival role for ASS1 in mesothelioma. **PLoS ONE**, vol. 11, no. 3, 2016. DOI 10.1371/journal.pone.0150044.

BARNES, T. A.; AMIR, E.; TEMPLETON, A. J.; GOMEZ-GARCIA, S.; NAVARRO, B.; SERUGA, B.; OCANA, A. Efficacy, safety, tolerability and price of newly approved drugs in solid tumors. **Cancer Treatment Reviews**, vol. 56, p. 1–7, 2017. DOI 10.1016/j.ctrv.2017.03.011.

BARRERA-RODRÍGUEZ, R.; FUENTES, J. M. Multidrug resistance characterization in multicellular tumour spheroids from two human lung cancer cell lines. **Cancer Cell International**, vol. 15, no. 1, 2015. DOI 10.1186/s12935-015-0200-6.

BARRILA, J.; RADTKE, A. L.; CRABBÉ, A.; SARKER, S. F.; HERBST-KRALOVETZ, M. M.; OTT, C. M.; NICKERSON, C. A. Organotypic 3D cell culture models: Using the rotating wall vessel to study hostĝ€"pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 8, no. 11, p. 791–801, 2010. DOI 10.1038/nrmicro2423.

BAUER, S.; WENNBERG HULDT, C.; KANEBRATT, K. P.; DURIEUX, I.; GUNNE, D.; ANDERSSON, S.; EWART, L.; HAYNES, W. G.; MASCHMEYER, I.; WINTER, A.; ÄMMÄLÄ, C.; MARX, U.; ANDERSSON, T. B. Functional coupling of human pancreatic islets and liver spheroids on-a-chip: Towards a novel human ex vivo type 2 diabetes model. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 1–11, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-14815-w.

BECK, B.; BLANPAIN, C. Unravelling cancer stem cell potential. **Nature Reviews Cancer**, vol. 13, no. 10, p. 727–738, 2013. DOI 10.1038/nrc3597.

BECK, B.; DRIESSENS, G.; GOOSSENS, S.; YOUSSEF, K. K.; KUCHNIO, A.; CAAUWE, A.; SOTIROPOULOU, P. A.; LOGES, S.; LAPOUGE, G.; CANDI, A.; MASCRE, G.; DROGAT, B.; DEKONINCK, S.; HAIGH, J. J.; CARMELIET, P.; BLANPAIN, C. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. **Nature**, vol. 478, no. 7369, p. 399–403, 2011. DOI 10.1038/nature10525.

BEER, M.; KUPPALU, N.; STEFANINI, M.; BECKER, H.; SCHULZ, I.; MANOLI, S.; SCHUETTE, J.; SCHMEES, C.; CASAZZA, A.; STELZLE, M.; ARCANGELI, A. A novel microfluidic 3D platform for culturing pancreatic ductal adenocarcinoma cells: Comparison with in vitro cultures and in vivo xenografts. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-01256-8.

BEISSNER, NICOLEBOLEA ALBERO, ANTONIOFÜLLER, JENDRIK KELLNER, THOMAS LAUTERBOEC, L.; LIANG, J.; BÖL, M.; GLASMACHER, B.; MÜLLER-GOYMANN, C. C.; REICHL, S. Improved in vitro models for preclinical drug and formulation screening focusing on 2D and 3D skin and cornea constructs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 126, no. November 2017, p. 57–66, 2018. DOI 10.1016/j.ejpb.2017.11.014.

BELL, C. C.; DANKERS, A. C. A.; LAUSCHKE, V. M.; SISON-YOUNG, R.; JENKINS, R.; ROWE, C.; GOLDRING, C. E.; PARK, K.; REGAN, S. L.; WALKER, T.; SCHOFIELD, C.; BAZE, A.; FOSTER, A. J.; WILLIAMS, D. P.; VAN DE VEN, A. W. M.; JACOBS, F.; VAN HOUDT, J.; LÄHTEENMÄKI, T.; SNOEYS, J.; … INGELMAN-SUNDBERG, M. Comparison of hepatic 2D sandwich cultures and 3d spheroids for long-term toxicity applications: A multicenter study. **Toxicological Sciences**, vol. 162, no. 2, p. 655–666, 2018. DOI 10.1093/toxsci/kfx289.

BENAM, K. H.; DAUTH, S.; HASSELL, B.; HERLAND, A.; JAIN, A.; JANG, K.-J.; KARALIS, K.; KIM, H. J.; MACQUEEN, L.; MAHMOODIAN, R.; MUSAH, S.; TORISAWA, Y.; VAN DER MEER, A. D.; VILLENAVE, R.; YADID, M.; PARKER, K. K.; INGBER, D. E. Engineered In Vitro Disease Models. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, vol. 10, no. 1, p. 195–262, 2015. DOI 10.1146/annurev-pathol-012414-040418.

BENFENATI, E.; GINI, G.; HOFFMANN, S.; LUTTIK, R. Comparing in vivo, in vitro and in silico methods and integrated strategies for chemical assessment: Problems and prospects. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, vol. 38, no. 2, p. 153–166, 2010. DOI 10.1177/026119291003800201.

BENIEN, P.; SWAMI, A. 3D tumor models: History, advances and future perspectives. **Future Oncology**, vol. 10, no. 7, p. 1311–1327, 2014. DOI 10.2217/fon.13.274.

BENTIVEGNA, A.; CONCONI, D.; PANZERI, E.; SALA, E.; BOVO, G.; VIGANÒ, P.; BRUNELLI, S.; BOSSI, M.; TREDICI, G.; STRADA, G.; DALPRÀ, L. Biological heterogeneity of putative bladder cancer stem-like cell populations from human bladder transitional cell carcinoma samples. **Cancer Science**, vol. 101, no. 2, p. 416–424, 2010. DOI 10.1111/j.1349-7006.2009.01414.x.

BERGMAN, A. M.; PINEDO, H. M.; TALIANIDIS, I.; VEERMAN, G.; LOVES, W. J. P.; VAN DER WILT, C. L.; PETERS, G. J. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, vol. 88, no. 12, p. 1963–1970, 2003. DOI 10.1038/sj.bjc.6601011.

BESANÇON, O. G.; TYTGAT, G. A. M.; MEINSMA, R.; LEEN, R.; HOEBINK, J.; KALAYDA, G. V.; JAEHDE, U.; CARON, H. N.; VAN KUILENBURG, A. B. P. Synergistic interaction between cisplatin and gemcitabine in neuroblastoma cell lines and multicellular tumor spheroids. **Cancer Letters**, vol. 319, no. 1, p. 23–30, 2012. DOI 10.1016/j.canlet.2011.12.016.

BHATIA, S. N.; INGBER, D. E. Microfluidic organs-on-chips. **Nature Biotechnology**, vol. 32, no. 8, p. 760–772, 2014. DOI 10.1038/nbt.2989.

BHUVANALAKSHMI, G.; ARFUSO, F.; MILLWARD, M.; DHARMARAJAN, A.; WARRIER, S. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits glioma stem-like cells by reversing epithelial to mesenchymal transition, inducing apoptosis and decreasing cancer stem cell properties. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 6, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0127517.

BINGEL, C.; KOENEKE, E.; RIDINGER, J.; BITTMANN, A.; SILL, M.; PETERZIEL, H.; WROBEL, J. K.; RETTIG, I.; MILDE, T.; FERNEKORN, U.; WEISE, F.; SCHOBER, A.; WITT, O.; OEHME, I. Three-dimensional tumor cell growth stimulates autophagic flux and recapitulates chemotherapy resistance. **Cell death & disease**, vol. 8, no. 8, p. e3013, 2017. DOI 10.1038/cddis.2017.398.

BJERKVIG, R.; LAERUM, O. D.; RUCKLIDGE, G. J. Immunocytochemical Characterization of Extracellular Matrix Proteins Expressed by Cultured Glioma Cells. **Cancer Research**, vol. 49, no. 19, p. 5424–5428, 1989.

BJERSAND, K.; MAHTEME, H.; SUNDSTRÖM POROMAA, I.; ANDRÉASSON, H.; GRAF, W.; LARSSON, R.; NYGREN, P. Drug Sensitivity Testing in Cytoreductive Surgery and Intraperitoneal Chemotherapy of Pseudomyxoma Peritonei. **Annals of Surgical Oncology**, vol. 22, p. 810–816, 2015. DOI 10.1245/s10434-015-4675-0.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 15, no. 12, p. 786–801, 2014. DOI 10.1038/nrm3904.

BORETTO, M.; MAENHOUDT, N.; LUO, X.; HENNES, A.; BOECKX, B.; BUI, B.; HEREMANS, R.; PERNEEL, L.; KOBAYASHI, H.; VAN ZUNDERT, I.; BREMS, H.; COX, B.; FERRANTE, M.; UJI-I, H.; KOH, K. P.; D'HOOGHE, T.; VANHIE, A.; VERGOTE, I.; MEULEMAN, C.; … VANKELECOM, H. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. **Nature Cell Biology**, vol. 21, no. 8, p. 1041–1051, 2019. DOI 10.1038/s41556-019-0360-z.

BRANCATO, V.; COMUNANZA, V.; IMPARATO, G.; CORÀ, D.; URCIUOLO, F.; NOGHERO, A.; BUSSOLINO, F.; NETTI, P. A. Bioengineered tumoral microtissues recapitulate desmoplastic reaction of pancreatic cancer. **Acta Biomaterialia**, vol. 49, p. 152–166, 2017. DOI 10.1016/j.actbio.2016.11.072.

BRANCATO, V.; OLIVEIRA, J. M.; CORRELO, V. M.; REIS, R. L.; KUNDU, S. C. **Could 3D models of cancer enhance drug screening?**. Elsevier Ltd, vol. 232, 2020. DOI 10.1016/j.biomaterials.2019.119744.

BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A population-based study. **The Lancet Oncology**, vol. 13, no. 8, p. 790–801, 2012. DOI 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. **Oncotarget**, vol. 7, no. 29, p. 45745–45756, 2016. DOI 10.18632/oncotarget.9935.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, vol. 18, no. 5-6, p. 240–249, 2013. DOI 10.1016/j.drudis.2012.10.003.

BROUTIER, L.; MASTROGIOVANNI, G.; VERSTEGEN, M. M. A.; FRANCIES, H. E.; GAVARRÓ, L. M.; BRADSHAW, C. R.; ALLEN, G. E.; ARNES-BENITO, R.; SIDOROVA, O.; GASPERSZ, M. P.; GEORGAKOPOULOS, N.; KOO, B. K.; DIETMANN, S.; DAVIES, S. E.; PRASEEDOM, R. K.; LIESHOUT, R.; IJZERMANS, J. N. M.; WIGMORE, S. J.; SAEB-PARSY, K.; … HUCH, M. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. **Nature Medicine**, vol. 23, no. 12, p. 1424–1435, 2017. DOI 10.1038/nm.4438.

BROWN, A. C.; BARKER, T. H. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. **Acta Biomaterialia**, vol. 10, no. 4, p. 1502–1514, 2014. DOI 10.1016/j.actbio.2013.09.008.

BRYAN, R. T. Bladder cancer and cancer stem cells: Basic science and implications for therapy. **TheScientificWorldJournal**, vol. 11, p. 1187–1194, 2011. DOI 10.1100/tsw.2011.117.

BRYAN, R. T. Cell adhesion and urothelial bladder cancer: The role of cadherin switching and related phenomena. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, vol. 370, no. 1661, 2015. DOI 10.1098/rstb.2014.0042.

BUCHANAN, C. F.; VOIGT, E. E.; SZOT, C. S.; FREEMAN, J. W.; VLACHOS, P. P.; RYLANDER, M. N. Three-dimensional microfluidic collagen hydrogels for investigating flow-mediated tumor-endothelial signaling and vascular organization. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, vol. 20, no. 1, p. 64–75, 2014. DOI 10.1089/ten.tec.2012.0731.

BURDEN, N.; CHAPMAN, K.; SEWELL, F.; ROBINSON, V. Pioneering better science through the 3Rs: An introduction to the National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research (NC3Rs). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, vol. 54, no. 2, p. 198–208, 2015.

BURDICK, J. A.; PRESTWICH, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. **Advanced Materials**, vol. 23, no. 12, 2011. DOI 10.1002/adma.201003963.

BURGUÉS, J. P.; GÓMEZ, L.; PONTONES, J. L.; VERA, C. D.; JIMÉNEZ-CRUZ, J. F.; OZONAS, M. A Chemosensitivity Test for Superficial Bladder Cancer Based on Three-Dimensional Culture of Tumour Spheroids. **European Urology**, vol. 51, no. 4, p. 962–970, 2007. DOI 10.1016/j.eururo.2006.10.034.

BYRNE, H. M. Dissecting cancer through mathematics: From the cell to the animal model. **Nature Reviews Cancer**, vol. 10, no. 3, p. 221–230, 2010. DOI 10.1038/nrc2808.

CACOPARDO, L.; COSTA, J.; GIUSTI, S.; BUONCOMPAGNI, L.; MEUCCI, S.; CORTI, A.; MATTEI, G.; AHLUWALIA, A. Real-time cellular impedance monitoring and imaging of biological barriers in a dual-flow membrane bioreactor. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 140, 2019. DOI 10.1016/j.bios.2019.111340.

CALIARI, S. R.; BURDICK, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. **Nature Methods**, vol. 13, no. 5, p. 405–414, 2016. DOI 10.1038/nmeth.3839.

CAMPBELL, P. J.; YACHIDA, S.; MUDIE, L. J.; STEPHENS, P. J.; PLEASANCE, E. D.; STEBBINGS, L. A.; MORSBERGER, L. A.; LATIMER, C.; MCLAREN, S.; LIN, M. L.; MCBRIDE, D. J.; VARELA, I.; NIK-ZAINAL, S. A.; LEROY, C.; JIA, M.; MENZIES, A.; BUTLER, A. P.; TEAGUE, J. W.; GRIFFIN, C. A.; … FUTREAL, P. A. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. **Nature**, vol. 467, no. 7319, p. 1109–1113, 2010. DOI 10.1038/nature09460.

CARLETTI, E.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 695, p. 17–39, 2011. DOI 10.1007/978-1-60761-984-0_2.

CARLSSON, J.; ACKER, H. Relations between ph, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. **International Journal of Cancer**, vol. 42, no. 5, p. 715–720, 1988. DOI 10.1002/ijc.2910420515.

CARVALHO, H. M.; TEEL, L. D.; GOPING, G.; O'BRIEN, A. D. A three-dimensional tissue culture model for the study of attach and efface lesion formation by enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli. **Cellular Microbiology**, vol. 7, no. 12, p. 1771–1781, 2005. DOI 10.1111/j.1462-5822.2004.00594.x.

CARVALHO, M. R.; LIMA, D.; REIS, R. L.; CORRELO, V. M.; OLIVEIRA, J. M. Evaluating Biomaterial- and Microfluidic-Based 3D Tumor Models. **Trends in Biotechnology**, vol. 33, no. 11, p. 667–678, 2015. DOI 10.1016/j.tibtech.2015.09.009.

CARVER, K.; MING, X.; JULIANO, R. L. Multicellular tumor spheroids as a model for assessing delivery of oligonucleotides in three dimensions. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, vol. 3, p. e153, 2014. DOI 10.1038/mtna.2014.5.

CASSIDY, J. W.; CALDAS, C.; BRUNA, A. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts. **Cancer Research**, vol. 75, no. 15, p. 2963–2968, 2015. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-15-0727.

CELLI, J. P.; RIZVI, I.; BLANDEN, A. R.; MASSODI, I.; GLIDDEN, M. D.; POGUE, B. W.; HASAN, T. An imaging-based platform for high-content, quantitative evaluation of therapeutic response in 3D tumour models. **Scientific Reports**, vol. 4, 2014. DOI 10.1038/srep03751.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Review: Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nature reviews. Cancer**, vol. 5, no. 1, p. 65–72, 2005. DOI 10.1038/nrc1529.

CHANG, T. T.; HUGHES-FULFORD, M. Monolayer and Spheroid Culture of Human Liver Hepatocellular Carcinoma Cell Line Cells Demonstrate and Functional Phenotypes. **Developmental Cell**, vol. 15, no. 3, p. 559–567, 2009.

CHATZINIKOLAIDOU, M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. **Drug Discovery Today**, vol. 21, no. 9, p. 1553–1560, 2016. DOI 10.1016/j.drudis.2016.06.024.

CHEN, C.; QI, X. J.; CAO, Y. W.; WANG, Y. H.; YANG, X. C.; SHAO, S. X.; NIU, H. T. Bladder Tumor Heterogeneity: The Impact on Clinical Treatment. **Urologia Internationalis**, vol. 95, no. 1, p. 1–8, 2015. DOI 10.1159/000370165.

CHEN, D.; YANG, L.; CHEN, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; GUO, Z.; ZHANG, L. W. Automated contour analysis of multi-cellular spheroids spreading through high content imaging. **Physical Biology**, vol. 15, no. 2, 2018. DOI 10.1088/1478-3975/aaa27b.

CHEN, W.; WONG, C.; VOSBURGH, E.; LEVINE, A. J.; FORAN, D. J.; XU, E. Y. High-throughput Image Analysis of Tumor Spheroids: A User-friendly Software Application to Measure the Size of Spheroids Automatically and Accurately. **Journal of Visualized Experiments**, no. 89, 2014. DOI 10.3791/51639.

CHITCHOLTAN, K.; SYKES, P. H.; EVANS, J. J. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. **Journal of Translational Medicine**, vol. 10, no. 1, 2012. DOI 10.1186/1479-5876-10-38.

CHITNIS, T.; WEINER, H. L. CNS inflammation and neurodegeneration. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 127, p. 3577–3587, 2017. DOI 10.1172/JCI90609.

CHOI, I. K.; STRAUSS, R.; RICHTER, M.; YUN, C. O.; LIEBER, A. Strategies to increase drug penetration in solid tumors. **Frontiers in Oncology**, vol. 3 JUL, 2013. DOI 10.3389/fonc.2013.00193.

CHOI, S. Y. C.; LIN, D.; GOUT, P. W.; COLLINS, C. C.; XU, Y.; WANG, Y. Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 79, p. 222–237, 2014. DOI 10.1016/j.addr.2014.09.009.

CHOI, Y. K.; PARK, K. G. Targeting glutamine metabolism for cancer treatment. **Biomolecules and Therapeutics**, vol. 26, no. 1, p. 19–28, 2018. DOI 10.4062/biomolther.2017.178.

CHOUAIB, S.; NOMAN, M. Z.; KOSMATOPOULOS, K.; CURRAN, M. A. Hypoxic stress: Obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer. **Oncogene**, vol. 36, no. 4, p. 439–445, 2017. DOI 10.1038/onc.2016.225.

CLEVERS, H. Modeling Development and Disease with Organoids. **Cell**, vol. 165, no. 7, p. 1586–1597, 2016. DOI 10.1016/j.cell.2016.05.082.

CLEVERS, H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. **Nature Medicine**, vol. 17, no. 3, p. 313–319, 2011. DOI 10.1038/nm.2304.

COLLINS, C.; DENISIN, A. K.; PRUITT, B. L.; NELSON, W. J. Changes in E-cadherin rigidity sensing regulate cell adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 114, no. 29, p. E5835–E5844, 2017. DOI 10.1073/pnas.1618676114.

CONDE, V. R.; OLIVEIRA, P. F.; NUNES, A. R.; ROCHA, C. S.; RAMALHOSA, E.; PEREIRA, J. A.; ALVES, M. G.; SILVA, B. M. The progression from a lower to a higher invasive stage of bladder cancer is associated with severe alterations in glucose and pyruvate metabolism. **Experimental Cell Research**, vol. 335, no. 1, p. 91–98, 2015. DOI 10.1016/j.yexcr.2015.04.007.

CONMY, S.; NASHEUER, H. The Use of Transgenic Mice in Cancer and Genome Stability Research. , p. 325–336, 2010. DOI 10.1007/978-90-481-3471-7.

COOKE, S. L.; NG, C. K. Y.; MELNYK, N.; GARCIA, M. J.; HARDCASTLE, T.; TEMPLE, J.; LANGDON, S.; HUNTSMAN, D.; BRENTON, J. D. Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma. **Oncogene**, vol. 29, no. 35, p. 4905–4913, 2010. DOI 10.1038/onc.2010.245.

CORDON-CARDO, C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, vol. 42, p. 154–165, 2008. DOI 10.1080/03008880802291915.

COSTA, E. C.; GASPAR, V. M.; COUTINHO, P.; CORREIA, I. J. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 111, no. 8, p. 1672–1685, 2014. DOI 10.1002/bit.25210.

COSTA, E. C.; MOREIRA, A. F.; DE MELO-DIOGO, D.; GASPAR, V. M.; CARVALHO, M. P.; CORREIA, I. J. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology Advances**, vol. 34, no. 8, p. 1427–1441, 2016. DOI 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.

COTE, R. J.; DATAR, R. H. Therapeutic approaches to bladder cancer: Identifying targets and mechanisms. 46., 2003. **Critical Reviews in Oncology/Hematolog,**. vol. 46, p. 67–83, 2003. DOI 10.1016/S1040-8428(03)00066-0.

COX, B. L.; ERICKSON-BHATT, S.; SZULCZEWSKI, J. M.; SQUIRRELL, J. M.; LUDWIG, K. D.; MACDONALD, E. B.; SWADER, R.; PONIK, S. M.; ELICEIRI, K. W.; FAIN, S. B. A novel bioreactor for combined magnetic resonance spectroscopy and optical imaging of metabolism in 3D cell cultures. **Magnetic Resonance in Medicine**, vol. 81, no. 5, p. 3379–3391, 2019. DOI 10.1002/mrm.27644.

COX, M. C.; REESE, L. M.; BICKFORD, L. R.; VERBRIDGE, S. S. Toward the Broad Adoption of 3D Tumor Models in the Cancer Drug Pipeline. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 1, no. 10, p. 877–894, 2015. DOI 10.1021/acsbiomaterials.5b00172.

CRAWFORD, S.; DIAMOND, D.; BRUSTOLON, L.; PENARRETA, R. Effect of increased extracellular Ca++ on microvesicle production and tumor spheroid formation. **Cancer Microenvironment**, vol. 4, no. 1, p. 93–103, 2011. DOI 10.1007/s12307-010-0049-0.

CUI, X.; HARTANTO, Y.; ZHANG, H. Advances in multicellular spheroids formation. **Journal of the Royal Society Interface**, vol. 14, no. 127, 2017. DOI 10.1098/rsif.2016.0877.

CURT, G. A. The use of animal models in cancer drug discovery and development. **Stem Cells**, vol. 12, no. 1, p. 23–29, 1994. DOI 10.1002/stem.5530120107.

CUSHING, M. C.; ANSETH, K. S. Hydrogel cell cultures. **Science**, vol. 316, no. 5828, p. 1133–1134, 2007. DOI 10.1126/science.1140171.

DABABNEH, A. B.; OZBOLAT, I. T. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. **Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME**, vol. 136, no. 6, 2014. DOI 10.1115/1.4028512.

DAI, X.; LIU, L.; OUYANG, J.; LI, X.; ZHANG, X.; LAN, Q.; XU, T. Coaxial 3D bioprinting of self-assembled multicellular heterogeneous tumor fibers. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-01581-y.

DALBAGNI, G. The management of superficial bladder cancer. **Nature Clinical Practice Urology**, vol. 4, no. 5, p. 254–260, 2007. DOI 10.1038/ncpuro0784.

DÄSTER, S.; AMATRUDA, N.; CALABRESE, D.; IVANEK, R.; TURRINI, E.; DROESER, R. A.; ZAJAC, P.; FIMOGNARI, C.; SPAGNOLI, G. C.; IEZZI, G.; MELE, V.; MURARO, M. G. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. **Oncotarget**, vol. 8, no. 1, Jan. 2017. DOI 10.18632/oncotarget.13857.

DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, vol. 101, no. 1-4, p. 675–686, 2018. DOI 10.1007/s00170-018-2876-y.

DAWSON, E.; MAPILI, G.; ERICKSON, K.; TAQVI, S.; ROY, K. Biomaterials for stem cell differentiation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 60, no. 2, p. 215–228, 2008. DOI 10.1016/j.addr.2007.08.037.

DEAVALL, D. G.; MARTIN, E. A.; HORNER, J. M.; ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Toxicology**, vol. 2012, 2012. DOI 10.1155/2012/645460.

DESMAISON, A.; FRONGIA, C.; GRENIER, K.; DUCOMMUN, B.; LOBJOIS, V. Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 12, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0080447.

DESOIZE, B.; JARDILLIER, J. C. Multicellular resistance: A paradigm for clinical resistance? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, vol. 36, no. 2-3, p. 193–207, 2000. DOI 10.1016/S1040-8428(00)00086-X.

DHAMECHA, D.; MOVSAS, R.; SANO, U.; MENON, J. U. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 569, 2019. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118627.

DICKREUTER, E.; CORDES, N. The cancer cell adhesion resistome: Mechanisms, targeting and translational approaches. **Biological Chemistry**, vol. 398, no. 7, p. 721–735, 2017. DOI 10.1515/hsz-2016-0326.

DIEHN, M.; CHO, R. W.; LOBO, N. A.; KALISKY, T.; DORIE, M. J.; KULP, A. N.; QIAN, D.; LAM, J. S.; AILLES, L. E.; WONG, M.; JOSHUA, B.; KAPLAN, M. J.; WAPNIR, I.; DIRBAS, F. M.; SOMLO, G.; GARBEROGLIO, C.; PAZ, B.; SHEN, J.; LAU, S. K.; … CLARKE, M. F. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. **Nature**, vol. 458, no. 7239, p. 780–783, 2009. DOI 10.1038/nature07733.

DIGIOVANNI, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. **Pharmacology and Therapeutics**, vol. 54, no. 1, p. 63–128, 1992. DOI 10.1016/0163-7258(92)90051-Z.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, vol. 47, p. 20–33, 2016. DOI 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012.

DING, L.; LEY, T. J.; LARSON, D. E.; MILLER, C. A.; KOBOLDT, D. C.; WELCH, J. S.; RITCHEY, J. K.; YOUNG, M. A.; LAMPRECHT, T.; MCLELLAN, M. D.; MCMICHAEL, J. F.; WALLIS, J. W.; LU, C.; SHEN, D.; HARRIS, C. C.; DOOLING, D. J.; FULTON, R. S.; FULTON, L. L.; CHEN, K.; … DIPERSIO, J. F. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, vol. 481, no. 7382, p. 506–510, 2012. DOI 10.1038/nature10738.

DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. **Science**, vol. 324, no. 5935, p. 1673–1677, 2009. DOI 10.1126/science.1171643.

DOHMEN, A. J. C.; SWARTZ, J. E.; VAN DEN BREKEL, M. W. M.; WILLEMS, S. M.; SPIJKER, R.; NEEFJES, J.; ZUUR, C. L. Feasibility of primary tumor culture models and preclinical prediction assays for head and neck cancer: A narrative review. **Cancers**, vol. 7, no. 3, p. 1716–1742, 2015. DOI 10.3390/cancers7030858.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 23, no. 3, p. 223–229, 2015. DOI 10.1016/j.jsps.2013.11.002.

DOMCKE, S.; SINHA, R.; LEVINE, D. A.; SANDER, C.; SCHULTZ, N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. **Nature Communications**, vol. 4, 2013. DOI 10.1038/ncomms3126.

DOUBLIER, S.; BELISARIO, D. C.; POLIMENI, M.; ANNARATONE, L.; RIGANTI, C.; ALLIA, E.; GHIGO, D.; BOSIA, A.; SAPINO, A. HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: A potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. **BMC Cancer**, vol. 12, 2012. DOI 10.1186/1471-2407-12-4.

DOZMOROV, M. G.; KYKER, K. D.; SABAN, R.; KNOWLTON, N.; DOZMOROV, I.; CENTOLA, M. B.; HURST, R. E. Analysis of the interaction of extracellular matrix and phenotype of bladder cancer cells. **BMC Cancer**, vol. 6, 2006. DOI 10.1186/1471-2407-6-12.

DRIESSENS, N.; VERSTEYHE, S.; GHADDHAB, C.; BURNIAT, A.; DE DEKEN, X.; VAN SANDE, J.; DUMONT, J. E.; MIOT, F.; CORVILAIN, B. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. **Endocrine-Related Cancer**, vol. 16, no. 3, p. 845–856, 2009. DOI 10.1677/ERC-09-0020.

DRURY, J. L.; DENNIS, R. G.; MOONEY, D. J. The tensile properties of alginate hydrogels. **Biomaterials**, vol. 25, no. 16, p. 3187–3199, 2004. DOI 10.1016/j.biomaterials.2003.10.002.

DURRETT, R.; FOO, J.; LEDER, K.; MAYBERRY, J.; MICHOR, F. Intratumor heterogeneity in evolutionary models of tumor progression. **Genetics**, vol. 188, no. 2, p. 461–477, 2011. DOI 10.1534/genetics.110.125724.

EDINGTON, C. D.; CHEN, W. L. K.; GEISHECKER, E.; KASSIS, T.; SOENKSEN, L. R.; BHUSHAN, B. M.; FREAKE, D.; KIRSCHNER, J.; MAASS, C.; TSAMANDOURAS, N.; VALDEZ, J.; COOK, C. D.; PARENT, T.; SNYDER, S.; YU, J.; SUTER, E.; SHOCKLEY, M.; VELAZQUEZ, J.; VELAZQUEZ, J. J.; GRIFFITH, L. G. Interconnected Microphysiological Systems for Quantitative Biology and Pharmacology Studies. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, 2018. DOI 10.1038/s41598-018-22749-0.

EDMONDSON, R.; BROGLIE, J. J.; ADCOCK, A. F.; YANG, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **ASSAY and Drug Development Technologies**, vol. 12, no. 4, p. 207–218, 2014. DOI 10.1089/adt.2014.573.

EIFLER, J. B.; SCARPATO, K. R.; CLARK, P. E. Management of noninvasive bladder cancers. **Current Opinion in Oncology**, vol. 27, no. 3, p. 185–190, 2015. DOI 10.1097/CCO.0000000000000173.

EIKENES, L.; TUFTO, I.; SCHNELL, E. A.; BJØRKØY, A.; DAVIES, C. D. L. Effect of collagenase and hyaluronidase on free and anomalous diffusion in multicellular spheroids and xenografts. **Anticancer Research**, vol. 30, no. 2, p. 359–368, 2010.

EKE, I.; CORDES, N. Dual targeting of EGFR and focal adhesion kinase in 3D grown HNSCC cell cultures. **Radiotherapy and Oncology**, vol. 99, no. 3, p. 279–286, 2011. DOI 10.1016/j.radonc.2011.06.006.

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 100, no. 1, p. 59–74, 2011. DOI 10.1002/jps.22257.

ENGLER, A. J.; SEN, S.; SWEENEY, H. L.; DISCHER, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, vol. 126, no. 4, p. 677–689, 2006. DOI 10.1016/j.cell.2006.06.044.

ENMON, R. M.; O'CONNOR, K. C.; SONG, H.; LACKS, D. J.; SCHWARTZ, D. K. Aggregation kinetics of well and poorly differentiated human prostate cancer cells. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 80, no. 5, p. 580–588, 2002. DOI 10.1002/bit.10394.

EVENSEN, N. A.; LI, J.; YANG, J.; YU, X.; SAMPSON, N. S.; ZUCKER, S.; CAO, J. Development of a high-throughput three-dimensional invasion assay for anti-cancer drug discovery. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 12, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0082811.

EYRICH, D.; BRANDL, F.; APPEL, B.; WIESE, H.; MAIER, G.; WENZEL, M.; STAUDENMAIER, R.; GOEPFERICH, A.; BLUNK, T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. **Biomaterials**, vol. 28, no. 1, p. 55–65, 2007. DOI 10.1016/j.biomaterials.2006.08.027.

FADAKA, A.; AJIBOYE, B.; OJO, O.; ADEWALE, O.; OLAYIDE, I.; EMUOWHOCHERE, R. Biology of glucose metabolization in cancer cells. **Journal of Oncological Sciences**, vol. 3, no. 2, p. 45–51, 2017. DOI 10.1016/j.jons.2017.06.002.

FADERO, P. E.; SHAH, M. Three dimensional (3D) modelling and surgical planning in trauma and orthopaedics. **Surgeon**, vol. 12, no. 6, p. 328–333, 2014. DOI 10.1016/j.surge.2014.03.008.

FALSO, M. J. S.; BUCHHOLZ, B. A.; WHITE, R. W. D. Stem-like Cells in Bladder Cancer Cell Lines with Differential Sensitivity to Cisplatin. **Anticancer Research**, vol. 32, no. 3, p. 733–738, 2012. .

FANG, Y.; EGLEN, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. **SLAS Discovery**, vol. 22, no. 5, p. 456–472, 2017. DOI 10.1177/1087057117696795.

FEHLAUER, F.; MUENCH, M.; RADES, D.; STALPERS, L. J. A.; LEENSTRA, S.; VAN DER VALK, P.; SLOTMAN, B.; SMID, E. J.; SMINIA, P. Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: Inhibition of cell proliferation and cell migration. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, vol. 131, no. 11, p. 723–732, 2005. DOI 10.1007/s00432-005-0014-3.

FENNEMA, E.; RIVRON, N.; ROUWKEMA, J.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE BOER, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, vol. 31, no. 2, p. 108–115, 2013. DOI 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.

FINNBERG, N. K.; GOKARE, P.; LEV, A.; GRIVENNIKOV, S. I.; MACFARLANE, A. W.; CAMPBELL, K. S.; WINTERS, R. M.; KAPUTA, K.; FARMA, J. M.; ABBAS, A. E.-S.; GRASSO, L.; NICOLAIDES, N. C.; EL-DEIRY, W. S. Application of 3D tumoroid systems to define immune and cytotoxic therapeutic responses based on tumoroid and tissue slice culture molecular signatures. **Oncotarget**, vol. 8, no. 40, 2017. DOI 10.18632/oncotarget.19965.

FLEETWOOD, G.; CHLEBUS, M.; COENEN, J.; DUDOIGNON, N.; LECERF, C.; MAISONNEUVE, C.; ROBINSON, S. Making progress and gaining momentum in global 3Rs efforts: How the European pharmaceutical industry is contributing. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, vol. 54, no. 2, p. 192–197, 2015. .

FONTANA, F.; RAIMONDI, M.; MARZAGALLI, M.; SOMMARIVA, M.; LIMONTA, P.; GAGLIANO, N. Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells. **Cells**, vol. 8, no. 2, p. 143, 2019. DOI 10.3390/cells8020143.

FOTY, R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. **Journal of Visualized Experiments**, no. 51, 2011. DOI 10.3791/2720.

FOTY, R. A.; STEINBERG, M. S. Differential adhesion in model systems. **Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology**, vol. 2, no. 5, p. 631–645, 2013. DOI 10.1002/wdev.104.

FOTY, R. A.; STEINBERG, M. S. The differential adhesion hypothesis: A direct evaluation. **Developmental Biology**, vol. 278, no. 1, p. 255–263, 2005. DOI 10.1016/j.ydbio.2004.11.012.

FRAIETTA, I.; GASPARRI, F. The development of high-content screening (HCS) technology and its importance to drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, vol. 11, no. 5, p. 501–514, 2016. DOI 10.1517/17460441.2016.1165203.

FRANCIA, G.; GREEN, S. K.; BOCCI, G.; MAN, S.; EMMENEGGER, U.; EBOS, J. M. L.; WEINERMAN, A.; SHAKED, Y.; KERBEL, R. S. Down-regulation of DNA mismatch repair proteins in human and murine tumor spheroids: Implications for multicellular resistance to alkylating agents. **Molecular Cancer Therapeutics**, vol. 4, no. 10, p. 1484–1494, 2005. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-04-0214.

FRANCO, S. S.; SZCZESNA, K.; ILIOU, M. S.; AL-QAHTANI, M.; MOBASHERI, A.; KOBOLÁK, J.; DINNYÉS, A. In vitro models of cancer stem cells and clinical applications. **BMC Cancer**, vol. 16, 2016. DOI 10.1186/s12885-016-2774-3.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition**, 2011. DOI 10.1002/9780470649367.

FRIEDMAN, A. A.; LETAI, A.; FISHER, D. E.; FLAHERTY, K. T. Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. **Nature Reviews Cancer**, vol. 15, no. 12, p. 747–756, 2015. DOI 10.1038/nrc4015.

FRIEDRICH, J.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - Old hat or new challenge? **International Journal of Radiation Biology**, vol. 83, no. 11-12, p. 849–871, 2007. DOI 10.1080/09553000701727531.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, vol. 4, no. 3, p. 309–324, 2009. DOI 10.1038/nprot.2008.226.

FRISCH, S. M.; VUORI, K.; RUOSLAHTI, E.; CHAN-HUI, P. Y. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. **Journal of Cell Biology**, vol. 134, no. 3, p. 793–799, 1996. DOI 10.1083/jcb.134.3.793.

FURTH, J.; KAHN, M. C. The transmission of leukemia of mice with a single cell. **American Journal of Cancer**, vol. 31, no. 2, p. 276–282, 1937. DOI 10.1158/ajc.1937.276.

GALATEANU, B.; HUDITA, A.; NEGREI, C.; ION, R. M.; COSTACHE, M.; STAN, M.; NIKITOVIC, D.; HAYES, A. W.; SPANDIDOS, D. A.; TSATSAKIS, A. M.; GINGHINA, O. Impact of multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model on anticancer drug response. **International Journal of Oncology**, vol. 48, no. 6, p. 2295–2302, 2016. DOI 10.3892/ijo.2016.3467.

GARDNER, J. K.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Three-dimensional rotating wall vessel-derived cell culture models for studying virus-host interactions. **Viruses**, vol. 8, no. 11, 2016. DOI 10.3390/v8110304.

GENCOGLU, M. F.; BARNEY, L. E.; HALL, C. L.; BROOKS, E. A.; SCHWARTZ, A. D.; CORBETT, D. C.; STEVENS, K. R.; PEYTON, S. R. Comparative Study of Multicellular Tumor Spheroid Formation Methods and Implications for Drug Screening. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 4, no. 2, p. 410–420, 2018. DOI 10.1021/acsbiomaterials.7b00069.

GHEIBI, P.; ZENG, S.; SON, K. J.; VU, T.; MA, A. H.; DALL'ERA, M. A.; YAP, S. A.; DE VERE WHITE, R. W.; PAN, C. X.; REVZIN, A. Microchamber Cultures of Bladder Cancer: A Platform for Characterizing Drug Responsiveness and Resistance in PDX and Primary Cancer Cells. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-12543-9.

GHOSH, S.; SPAGNOLI, G. C.; MARTIN, I.; PLOEGERT, S.; DEMOUGIN, P.; HEBERER, M.; RESCHNER, A. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 204, no. 2, p. 522–531, 2005. DOI 10.1002/jcp.20320.

GILBERT, C. A.; ROSS, A. H. Cancer stem cells: Cell culture, markers, and targets for new therapies. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 108, no. 5, p. 1031–1038, 2009. DOI 10.1002/jcb.22350.

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**, vol. 329, no. 5995, p. 1078–1081, 2010. DOI 10.1126/science.1191035.

GILL, B. J.; WEST, J. L. Modeling the tumor extracellular matrix: Tissue engineering tools repurposed towards new frontiers in cancer biology. **Journal of Biomechanics**, vol. 47, no. 9, p. 1969–1978, 2014. DOI 10.1016/j.jbiomech.2013.09.029.

GILLET, J. P.; VARMA, S.; GOTTESMAN, M. M. The clinical relevance of cancer cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 105, no. 7, p. 452–458, 2013. DOI 10.1093/jnci/djt007.

GILLOTEAUX, J.; JAMISON, J. M.; NEAL, D. R.; LOUKAS, M.; DOBERZSTYN, T.; SUMMERS, J. L. Cell damage and death by autoschizis in human bladder (RT4) carcinoma cells resulting from treatment with ascorbate and menadione. **Ultrastructural Pathology**, vol. 34, no. 3, p. 140–160, 2010. DOI 10.3109/01913121003662304.

GILMORE, A. P.; METCALFE, A. D.; ROMER, L. H.; STREULI, C. H. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. **Journal of Cell Biology**, vol. 149, no. 2, p. 431–445, 2000. DOI 10.1083/jcb.149.2.431.

GINAI, M.; ELSBY, R.; HEWITT, C. J.; SURRY, D.; FENNER, K.; COOPMAN, K. The use of bioreactors as in vitro models in pharmaceutical research. **Drug Discovery Today**, vol. 18, no. 19-20, p. 922–935, 2013. DOI 10.1016/j.drudis.2013.05.016.

GIOIELLA, F.; URCIUOLO, F.; IMPARATO, G.; BRANCATO, V.; NETTI, P. A. An Engineered Breast Cancer Model on a Chip to Replicate ECM-Activation In Vitro during Tumor Progression. **Advanced Healthcare Materials**, vol. 5, no. 23, p. 3074–3084, 2016. DOI 10.1002/adhm.201600772.

GIRARD, Y. K.; WANG, C.; RAVI, S.; HOWELL, M. C.; MALLELA, J.; ALIBRAHIM, M.; GREEN, R.; HELLERMANN, G.; MOHAPATRA, S. S.; MOHAPATRA, S. A 3D Fibrous Scaffold Inducing Tumoroids: A Platform for Anticancer Drug Development. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 10, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0075345.

GONG, X.; LIN, C.; CHENG, J.; SU, J.; ZHAO, H.; LIU, T.; WEN, X.; ZHAO, P. Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 6, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0130348.

GOODSPEED, A.; HEISER, L. M.; GRAY, J. W.; COSTELLO, J. C. Tumor-derived cell lines as molecular models of cancer pharmacogenomics. **Molecular Cancer Research**, vol. 14, no. 1, p. 3–13, 2016. DOI 10.1158/1541-7786.MCR-15-0189.

GOUBKO, C. A.; BASAK, A.; MAJUMDAR, S.; CAO, X. Dynamic cell patterning of photoresponsive hyaluronic acid hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, vol. 102, no. 2, p. 381–391, 2014. DOI 10.1002/jbm.a.34712.

GRAVEL, M.; GROSS, T.; VAGO, R.; TABRIZIAN, M. Responses of mesenchymal stem cell to chitosan-coralline composites microstructured using coralline as gas forming agent. **Biomaterials**, vol. 27, no. 9, p. 1899–1906, 2006. DOI 10.1016/j.biomaterials.2005.10.020.

GRAY, J. W.; MILLS, G. B. Large-scale drug screens support precision medicine. **Cancer Discovery**, vol. 5, no. 11, p. 1130–1132, 2015. DOI 10.1158/2159-8290.CD-15-0945.

GRAY, L. H.; CONGER, A. D.; EBERT, M.; HORNSEY, S.; SCOTT, O. C. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. **The British journal of radiology**, vol. 26, no. 312, p. 638–648, 1953. DOI 10.1259/0007-1285-26-312-638.

GREEN, S. K.; FRANCIA, G.; ISIDORO, C.; KERBEL, R. S. Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. **Molecular Cancer Therapeutics**, vol. 3, no. 2, p. 149–159, 2004. .

GRIMES, D. R.; FLETCHER, A. G.; PARTRIDGE, M. Oxygen consumption dynamics in steady-state tumour models. **Royal Society Open Science**, vol. 1, no. 1, 2014. DOI 10.1098/rsos.140080.

GRIMES, D. R.; PARTRIDGE, M. A mechanistic investigation of the oxygen fixation hypothesis and oxygen enhancement ratio. **Biomedical Physics & Engineering Express**, vol. 1, no. 4, p. 045209, 2015. DOI 10.1088/2057-1976/1/4/045209.

GRINNELL, F. Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. **Trends in Cell Biology**, vol. 10, p. 362–365, 2000. DOI 10.1016/S0962-8924(00)01802-X.

GROLMAN, J. M.; ZHANG, D.; SMITH, A. M.; MOORE, J. S.; KILIAN, K. A. Rapid 3D Extrusion of Synthetic Tumor Microenvironments. **Advanced Materials**, vol. 27, no. 37, p. 5512–5517, 2015. DOI 10.1002/adma.201501729.

GRUNDY, T. J.; DE LEON, E.; GRIFFIN, K. R.; STRINGER, B. W.; DAY, B. W.; FABRY, B.; COOPER-WHITE, J.; O'NEILL, G. M. Differential response of patient-derived primary glioblastoma cells to environmental stiffness. **Scientific Reports**, vol. 6, 2016. DOI 10.1038/srep23353.

GU, C.; DU, Y. R.; GAO, Y.; YAO, Z.; GU, X.; ZHANG, Q. Y.; XU, J. J.; DENG, W. M. Anti-CD44 mAb remodels biological behaviors of spheroid cells with stemness from human ovarian cancer cell line SKOV-3. **Chinese Science Bulletin**, vol. 57, no. 11, p. 1288–1297, 2012. DOI 10.1007/s11434-012-5075-5.

GUNNESS, P.; MUELLER, D.; SHEVCHENKO, V.; HEINZLE, E.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; NOOR, F. 3D organotypic cultures of human heparg cells: A tool for in vitro toxicity studies. **Toxicological Sciences**, vol. 133, no. 1, p. 67–78, 2013. DOI 10.1093/toxsci/kft021.

GUPTA, N.; LIU, J. R.; PATEL, B.; SOLOMON, D. E.; VAIDYA, B.; GUPTA, V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. **Bioengineering & Translational Medicine**, vol. 1, no. 1, p. 63–81, 2016. DOI 10.1002/btm2.10013.

GURSKI, L. A.; PETRELLI, N. J.; JIA, X.; FARACH-CARSON, M. C. 3D Matrices for Anti-Cancer Drug Testing and Development. **Oncology Issues**, vol. 25, no. 1, p. 20–25, 2010. DOI 10.1080/10463356.2010.11883480.

HACHEY, S. J.; HUGHES, C. C. W. Applications of tumor chip technology. **Lab on a Chip**, vol. 18, no. 19, p. 2893–2912, 2018. DOI 10.1039/c8lc00330k.

HAISLER, W. L.; TIMM, D. M.; GAGE, J. A.; TSENG, H.; KILLIAN, T. C.; SOUZA, G. R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, vol. 8, no. 10, p. 1940–1949, 2013. DOI 10.1038/nprot.2013.125.

HAM, S. L.; JOSHI, R.; LUKER, G. D.; TAVANA, H. Engineered Breast Cancer Cell Spheroids Reproduce Biologic Properties of Solid Tumors. **Advanced Healthcare Materials**, vol. 5, no. 21, p. 2788–2798, 2016. DOI 10.1002/adhm.201600644.

HAMBURGER, A. W.; SALMON, S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells. **Science**, vol. 197, no. 4302, p. 461–463, 1977. DOI 10.1126/science.560061.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, vol. 144, no. 5, p. 646–674, 2011. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HANDORF, A. M.; ZHOU, Y.; HALANSKI, M. A.; LI, W. J. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. **Organogenesis**, vol. 11, no. 1, p. 1–15, 2015. DOI 10.1080/15476278.2015.1019687.

HANN, B.; BALMAIN, A. Building “validated” mouse models of human cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 13, no. 6, p. 778–784, 2001. DOI 10.1016/S0955-0674(00)00283-0.

HAO, S.; HA, L.; CHENG, G.; WAN, Y.; XIA, Y.; SOSNOSKI, D. M.; MASTRO, A. M.; ZHENG, S. Y. A Spontaneous 3D Bone-On-a-Chip for Bone Metastasis Study of Breast Cancer Cells. **Small**, vol. 14, no. 12, 2018. DOI 10.1002/smll.201702787.

HARDELAUF, H.; FRIMAT, J. P.; STEWART, J. D.; SCHORMANN, W.; CHIANG, Y. Y.; LAMPEN, P.; FRANZKE, J.; HENGSTLER, J. G.; CADENAS, C.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; WEST, J. Microarrays for the scalable production of metabolically relevant tumour spheroids: A tool for modulating chemosensitivity traits. **Lab on a Chip**, vol. 11, no. 3, p. 419–428, 2011. DOI 10.1039/c0lc00089b.

HÄRMÄ, V.; SCHUKOV, H. P.; HAPPONEN, A.; AHONEN, I.; VIRTANEN, J.; SIITARI, H.; ÅKERFELT, M.; LÖTJÖNEN, J.; NEES, M. Quantification of dynamic morphological drug responses in 3D organotypic cell cultures by automated image analysis. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 5, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0096426.

HASSELL, B. A.; GOYAL, G.; LEE, E.; SONTHEIMER-PHELPS, A.; LEVY, O.; CHEN, C. S.; INGBER, D. E. Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro. **Cell Reports**, vol. 21, no. 2, p. 508–516, 2017. DOI 10.1016/j.celrep.2017.09.043.

HAYCOCK, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 695, p. 1–15, 2011. DOI 10.1007/978-1-60761-984-0_1.

HEAMS, T. Selection within organisms in the nineteenth century: Wilhelm Roux’s complex legacy. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, vol. 110, no. 1, p. 24–33, 2012. DOI 10.1016/j.pbiomolbio.2012.04.004.

HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, vol. 324, no. 5930, p. 1029–1033, 2009. DOI 10.1126/science.1160809.

HENDRIKS, J.; RIESLE, J.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Co-culture in cartilage tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, vol. 1, no. 3, p. 170–178, 2007. DOI 10.1002/term.19.

HICKMAN, J. A.; GRAESER, R.; DE HOOGT, R.; VIDIC, S.; BRITO, C.; GUTEKUNST, M.; VAN DER KUIP, H.; IMI PREDECT CONSORTIUM. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. **Biotechnology Journal**, vol. 9, no. 9, p. 1115–1128, 2014. DOI 10.1002/biot.201300492.

HIDALGO, M.; AMANT, F.; BIANKIN, A. V.; BUDINSKÁ, E.; BYRNE, A. T.; CALDAS, C.; CLARKE, R. B.; DE JONG, S.; JONKERS, J.; MÆLANDSMO, G. M.; ROMAN-ROMAN, S.; SEOANE, J.; TRUSOLINO, L.; VILLANUEVA, A. Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discovery**, vol. 4, no. 9, p. 998–1013, 2014. DOI 10.1158/2159-8290.CD-14-0001.

HIRSCHHAEUSER, F.; MENNE, H.; DITTFELD, C.; WEST, J.; MUELLER-KLIESER, W.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, vol. 148, no. 1, p. 3–15, 2010. DOI 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.

HIRSCHHAEUSER, F.; SATTLER, U. G. A.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate: A metabolic key player in cancer. **Cancer Research**, vol. 71, no. 22, p. 6921–6925, 2011. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.

HIRST, J.; PATHAK, H. B.; HYTER, S.; PESSETTO, Z. Y.; LY, T.; GRAW, S.; KOESTLER, D. C.; KRIEG, A. J.; ROBY, K. F.; GODWIN, A. K. Licofelone enhances the efficacy of paclitaxel in ovarian cancer by reversing drug resistance and tumor stem-like properties. **Cancer Research**, vol. 78, no. 15, p. 4370–4385, 2018. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-17-3993.

HÖCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 93, no. 4, p. 266–276, 2001. DOI 10.1093/jnci/93.4.266.

HOLLE, A. W.; YOUNG, J. L.; SPATZ, J. P. In vitro cancer cell-ECM interactions inform in vivo cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 97, p. 270–279, 2016. DOI 10.1016/j.addr.2015.10.007.

HONGISTO, V.; JERNSTRÖM, S.; FEY, V.; MPINDI, J. P.; KLEIVI SAHLBERG, K.; KALLIONIEMI, O.; PERÄLÄ, M. High-Throughput 3D Screening Reveals Differences in Drug Sensitivities between Culture Models of JIMT1 Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 10, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0077232.

HOQUE, M. T.; WINDUS, L. C. E.; LOVITT, C. J.; AVERY, V. M. PCaAnalyser: A 2D-image analysis based module for effective determination of prostate cancer progression in 3D culture. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 11, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0079865.

HOTARY, K. B.; ALLEN, E. D.; BROOKS, P. C.; DATTA, N. S.; LONG, M. W.; WEISS, S. J. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. **Cell**, vol. 114, no. 1, p. 33–45, 2003. DOI 10.1016/S0092-8674(03)00513-0.

HOU, Y.; KONEN, J.; BRAT, D. J.; MARCUS, A. I.; COOPER, L. A. D. TASI: A software tool for spatial-temporal quantification of tumor spheroid dynamics. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, 2018. DOI 10.1038/s41598-018-25337-4.

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K.; LONGACRE, M.; SNYDER, N.; SARKAR, S. Drug resistance in cancer: An overview. **Cancers**, vol. 6, no. 3, p. 1769–1792, 2014. DOI 10.3390/cancers6031769.

HSIEH, C. H.; CHEN, Y. D.; HUANG, S. F.; WANG, H. M.; WU, M. H. The effect of primary cancer cell culture models on the results of drug chemosensitivity assays: The application of perfusion microbioreactor system as cell culture vessel. **BioMed Research International**, vol. 2015, 2015. DOI 10.1155/2015/470283.

HUANG, H.; DING, Y.; SUN, X. S.; NGUYEN, T. A. Peptide Hydrogelation and Cell Encapsulation for 3D Culture of MCF-7 Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 3, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0059482.

HUANG, J.; LO, U. G.; WU, S.; WANG, B.; PONG, R. C.; LAI, C. H.; LIN, H.; HE, D.; HSIEH, J. T.; WU, K. The roles and mechanism of IFIT5 in bladder cancer epithelial–mesenchymal transition and progression. **Cell Death and Disease**, vol. 10, no. 6, 2019. DOI 10.1038/s41419-019-1669-z.

HUGHES, C. S.; POSTOVIT, L. M.; LAJOIE, G. A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. **Proteomics**, vol. 10, no. 9, p. 1886–1890, 2010. DOI 10.1002/pmic.200900758.

HUNT, M. M.; MENG, G.; RANCOURT, D. E.; GATES, I. D.; KALLOS, M. S. Factorial experimental design for the culture of human embryonic stem cells as aggregates in stirred suspension bioreactors reveals the potential for interaction effects between bioprocess parameters. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, vol. 20, no. 1, p. 76–89, 2014. DOI 10.1089/ten.tec.2013.0040.

HUTCHINSON, L.; KIRK, R. High drug attrition rates - Where are we going wrong? **Nature Reviews Clinical Oncology**, vol. 8, no. 4, p. 189–190, 2011. DOI 10.1038/nrclinonc.2011.34.

HWANG, H.; PARK, J.; SHIN, C.; DO, Y.; CHO, Y. K. Three dimensional multicellular co-cultures and anti-cancer drug assays in rapid prototyped multilevel microfluidic devices. **Biomedical Microdevices**, vol. 15, no. 4, p. 627–634, 2013. DOI 10.1007/s10544-012-9733-9.

HWANG, T. J.; CARPENTER, D.; LAUFFENBURGER, J. C.; WANG, B.; FRANKLIN, J. M.; KESSELHEIM, A. S. Failure of investigational drugs in late-stage clinical development and publication of trial results. **JAMA Internal Medicine**, vol. 176, no. 12, p. 1826–1833, 2016. DOI 10.1001/jamainternmed.2016.6008.

INAMDAR, N. K.; BORENSTEIN, J. T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 22, no. 5, p. 681–689, 2011. DOI 10.1016/j.copbio.2011.05.512.

INGRAM, M.; TECHY, G. B.; WARD, B. R.; IMAM, S. A.; ATKINSON, R.; HO, H.; TAYLOR, C. R. Tissue engineered tumor models. **Biotechnic and Histochemistry**, vol. 85, no. 4, p. 213–229, 2010. DOI 10.3109/10520295.2010.483655.

INOUE, R.; HIROHASHI, Y.; KITAMURA, H.; NISHIDA, S.; MURAI, A.; TAKAYA, A.; YAMAMOTO, E.; MATSUKI, M.; TANAKA, T.; KUBO, T.; NAKATSUGAWA, M.; KANASEKI, T.; TSUKAHARA, T.; SATO, N.; MASUMORI, N.; TORIGOE, T. GRIK2 has a role in the maintenance of urothelial carcinoma stem-like cells, and its expression is associated with poorer prognosis. **Oncotarget**, vol. 8, no. 17, p. 28826–28839, 2017. DOI 10.18632/oncotarget.16259.

INCA. Estimativa 2018: incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância, Coodenação de Ensino, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: http://www.oncoguia.org.br/pub/material_apoio/material_apoio_4f42_180205_2830.pdf. Acesso em 15/12/2019.

IQVIA. Câncer no Brasil: A jornada do paciente no sistema de saúde e seus impactos sociais e financeiro. IQVIA, The Human Data Science Company™, 2017. Disponível em: https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/cancer-no-brasil-n-a-jornada-do-paciente-no-sistema-de-saude-e-seus-impactos-sociais-e-financeiros-interfarma.pdf. Acesso em 11.03.2020.

IVANOV, D. P.; PARKER, T. L.; WALKER, D. A.; ALEXANDER, C.; ASHFORD, M. B.; GELLERT, P. R.; GARNETT, M. C. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 8, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0103817.

IVASCU, A.; KUBBIES, M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. **Journal of Biomolecular Screening**, vol. 11, no. 8, p. 922–932, 2006. DOI 10.1177/1087057106292763.

JACOBS, J. B.; ARAI, M.; COHEN, S. M.; FRIEDELL, G. H. Early Lesions in Experimental Bladder Cancer: Scanning Electron Microscopy of Cell Surface Markers. **Cancer Research**, vol. 36, p. 2512–2517, 1976. .

JAGANATHAN, H.; GAGE, J.; LEONARD, F.; SRINIVASAN, S.; SOUZA, G. R.; DAVE, B.; GODIN, B. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. **Scientific Reports**, vol. 4, 2014. DOI 10.1038/srep06468.

JAKUBIKOVA, J.; CHOLUJOVA, D.; HIDESHIMA, T.; GRONESOVA, P.; SOLTYSOVA, A.; HARADA, T.; JOO, J.; KONG, S. Y.; SZALAT, R. E.; RICHARDSON, P. G.; MUNSHI, N. C.; DORFMAN, D. M.; ANDERSON, K. C. A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: Biologic and clinical applications. **Oncotarget**, vol. 7, no. 47, p. 77326–77341, 2016. DOI 10.18632/oncotarget.12643.

JANIK, K.; POPEDA, M.; PECIAK, J.; ROSIAK, K.; SMOLARZ, M.; TREDA, C.; RIESKE, P.; STOCZYNSKA-FIDELUS, E.; KSIAZKIEWICZ, M. Efficient and simple approach to in vitro culture of primary epithelial cancer cells. **Bioscience Reports**, vol. 36, no. 6, p. 1–12, 2016. DOI 10.1042/BSR20160208.

JAROCH, K.; JAROCH, A.; BOJKO, B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 147, p. 297–312, 2018. DOI 10.1016/j.jpba.2017.07.023.

JEANES, A.; GOTTARDI, C. J.; YAP, A. S. Cadherins and cancer: How does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene**, vol. 27, no. 55, p. 6920–6929, 2008. DOI 10.1038/onc.2008.343.

JEON, J. S.; BERSINI, S.; GILARDI, M.; DUBINI, G.; CHAREST, J. L.; MORETTI, M.; KAMM, R. D. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 112, no. 1, p. 214–219, 2015. DOI 10.1073/pnas.1417115112.

JIANG, W.; HARDING, K. Enhancement of wound tissue expansion and angiogenesis by matrix-embedded fibroblast (dermagraft), a role of hepatocyte growth factor/scatter factor. **International journal of molecular medicine**, vol. 2, no. 2, p. 203–210, 1998. .

JIANG, Y. J.; LEE, C. L.; WANG, Q.; ZHOU, Z. W.; YANG, F.; JIN, C.; FU, D. L. Establishment of an orthotopic pancreatic cancer mouse model: Cells suspended and injected in Matrigel. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 20, no. 28, p. 9476–9485, 2014. DOI 10.3748/wjg.v20.i28.9476.

JODDAR, B.; GARCIA, E.; CASAS, A.; STEWART, C. M. Development of functionalized multi-walled carbon-nanotube-based alginate hydrogels for enabling biomimetic technologies. **Scientific Reports**, vol. 6, 2016. DOI 10.1038/srep32456.

JONES, R. S.; PARKER, M. D.; MORRIS, M. E. Quercetin, Morin, Luteolin, and Phloretin Are Dietary Flavonoid Inhibitors of Monocarboxylate Transporter 6. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 14, no. 9, p. 2930–2936, 2017. DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00264.

JONG, B. K. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 15, no. 5 SPEC. ISS., p. 365–377, 2005. DOI 10.1016/j.semcancer.2005.05.002.

JONKER, A. M.; LÖWIK, D. W. P. M.; VAN HEST, J. C. M. Peptide- and protein-based hydrogels. **Chemistry of Materials**, vol. 24, no. 5, p. 759–773, 2012. DOI 10.1021/cm202640w.

JUNG, H. R.; KANG, H. M.; RYU, J. W.; KIM, D. S.; NOH, K. H.; KIM, E. S.; LEE, H. J.; CHUNG, K. S.; CHO, H. S.; KIM, N. S.; IM, D. S.; LIM, J. H.; JUNG, C. R. Cell Spheroids with Enhanced Aggressiveness to Mimic Human Liver Cancer in Vitro and in Vivo. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-10828-7.

JUSTICE, B. A.; BADR, N. A.; FELDER, R. A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. **Drug Discovery Today**, vol. 14, no. 1-2, p. 102–107, 2009. DOI 10.1016/j.drudis.2008.11.006.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 119, no. 6, p. 1420–1428, 2009. DOI 10.1172/JCI39104.

KANG, A. R.; SEO, H. I.; CHUNG, B. G.; LEE, S. H. Concave microwell array-mediated three-dimensional tumor model for screening anticancer drug-loaded nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, vol. 11, no. 5, p. 1153–1161, 2015. DOI 10.1016/j.nano.2015.02.009.

KAPAŁCZYŃSKA, M.; KOLENDA, T.; PRZYBYŁA, W.; ZAJĄCZKOWSKA, M.; TERESIAK, A.; FILAS, V.; IBBS, M.; BLIŹNIAK, R.; ŁUCZEWSKI, Ł.; LAMPERSKA, K. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science**, vol. 14, no. 4, p. 910–919, 2018. DOI 10.5114/aoms.2016.63743.

KAUFMAN, D. S.; SHIPLEY, W. U.; FELDMAN, A. S. Bladder cancer. **The Lancet**, vol. 374, no. 9685, p. 239–249, 2009. DOI 10.1016/S0140-6736(09)60491-8.

KAUSHIK, V.; YAKISICH, J. S.; KULKARNI, Y.; AZAD, N.; IYER, A. K. V. Chemoresistance of Lung Cancer Cells: 2D and 3D In Vitro Models for Anticancer Drug Screening. **Lung Cancer - Strategies for Diagnosis and Treatment**, 2018. DOI 10.5772/intechopen.78946.

KELLAND, L. R. “Of mice and men”: Values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. **European Journal of Cancer**, vol. 40, no. 6, p. 827–836, 2004. DOI 10.1016/j.ejca.2003.11.028.

KELM, J. M.; TIMMINS, N. E.; BROWN, C. J.; FUSSENEGGER, M.; NIELSEN, L. K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 83, no. 2, p. 173–180, 2003. DOI 10.1002/bit.10655.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; MYERS, C. A.; NEVE, R. M.; SEMEIKS, J. R.; SPELLMAN, P. T.; LORENZ, K.; LEE, E. H.; BARCELLOS-HOFF, M. H.; PETERSEN, O. W.; GRAY, J. W.; BISSELL, M. J. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular Oncology**, vol. 1, no. 1, p. 84–96, 2007. DOI 10.1016/j.molonc.2007.02.004.

KESSEL, S.; CRIBBES, S.; BONASU, S.; RICE, W.; QIU, J.; CHAN, L. L. Y. Real-time viability and apoptosis kinetic detection method of 3D multicellular tumor spheroids using the Celigo Image Cytometer. **Cytometry Part A**, vol. 91, no. 9, p. 883–892, 2017. DOI 10.1002/cyto.a.23143.

KHAITAN, D.; CHANDNA, S.; ARYA, M. B.; DWARAKANATH, B. S. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy. **Journal of Translational Medicine**, vol. 4, 2006. DOI 10.1186/1479-5876-4-12.

KIEFER, F. W.; ORASANU, G.; NALLAMSHETTY, S.; BROWN, J. D.; WANG, H.; LUGER, P.; QI, N. R.; BURANT, C. F.; DUESTER, G.; PLUTZKY, J. Retinaldehyde dehydrogenase 1 coordinates hepatic gluconeogenesis and lipid metabolism. **Endocrinology**, vol. 153, no. 7, p. 3089–3099, 2012. DOI 10.1210/en.2011-2104.

KIEVIT, F. M.; WANG, K.; ERICKSON, A. E.; LAN LEVENGOOD, S. K.; ELLENBOGEN, R. G.; ZHANG, M. Modeling the tumor microenvironment using chitosan-alginate scaffolds to control the stem-like state of glioblastoma cells. **Biomaterials Science**, vol. 4, no. 4, p. 610–613, 2016. DOI 10.1039/c5bm00514k.

KIM, H.; PHUNG, Y.; HO, M. Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: An ex vivo matrix-free mesothelioma spheroid model. **PLoS ONE**, vol. 7, no. 6, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0039556.

KIM, I. Y.; SEO, S. J.; MOON, H. S.; YOO, M. K.; PARK, I. Y.; KIM, B. C.; CHO, C. S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, vol. 26, no. 1, p. 1–21, 2008. DOI 10.1016/j.biotechadv.2007.07.009.

KIM, M.; MUN, H.; SUNG, C. O.; CHO, E. J.; JEON, H. J.; CHUN, S. M.; JUNG, D. J.; SHIN, T. H.; JEONG, G. S.; KIM, D. K.; CHOI, E. K.; JEONG, S. Y.; TAYLOR, A. M.; JAIN, S.; MEYERSON, M.; JANG, S. J. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. **Nature Communications**, vol. 10, no. 1, 2019. DOI 10.1038/s41467-019-11867-6.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. The role of apoptosis in cancer cell survival and therapeutic outcome. **Cancer Biology and Therapy**, vol. 5, no. 11, p. 1429–1442, 2006. DOI 10.4161/cbt.5.11.3456.

KIRSCH, D. G.; KASTAN, M. B. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 16, no. 9, p. 3158–3168, 1998. https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.9.3158.

KITAMURA, H.; KAKEHI, Y. Treatment and management of high-grade T1 bladder cancer: What should we do after second TUR? **Japanese Journal of Clinical Oncology**, vol. 45, no. 4, p. 315–322, 2015. DOI 10.1093/jjco/hyu219.

KNIGHT, E.; MURRAY, B.; CARNACHAN, R.; PRZYBORSKI, S. Alvetex®: polystyrene scaffold technology for routine three dimensional cell culture. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 695, p. 323–340, 2011. DOI 10.1007/978-1-60761-984-0_20.

KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. **Journal of Anatomy**, vol. 227, no. 6, p. 746–756, 2015. DOI 10.1111/joa.12257.

KNOWLES, M. A. Molecular pathogenesis of bladder cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, vol. 13, no. 4, p. 287–297, 2008. DOI 10.1007/s10147-008-0812-0.

KOHNO, N.; OHNUMA, T.; TRUOG, P. Effects of hyaluronidase on doxorubicin penetration into squamous carcinoma multicellular tumor spheroids and its cell lethality. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, vol. 120, no. 5, p. 293–297, 1994. DOI 10.1007/BF01236386.

KOLEDOVA, Z. 3D cell culture: An introduction. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1612, 2017 . DOI 10.1007/978-1-4939-7021-6_1.

KONDO, T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. Cancer Biomarkers, vol. 3, p. 245–250, 2007. Doi: 10.3233/cbm-2007-34-508.

KONSTORUM, A.; VELLA, A. T.; ADLER, A. J.; LAUBENBACHER, R. C. Addressing current challenges in cancer immunotherapy with mathematical and computational modelling. **Journal of the Royal Society Interface**, vol. 14, no. 131, 2017. DOI 10.1098/rsif.2017.0150.

KOSTARELOS, K.; EMFIETZOGLOU, D.; PAPAKOSTAS, A.; YANG, W. H.; BALLANGRUD, Å.; SGOUROS, G. Binding and interstitial penetration of liposomes within avascular tumor spheroids. **International Journal of Cancer**, vol. 112, no. 4, p. 713–721, 2004. DOI 10.1002/ijc.20457.

KRAUSZ, E.; DE HOOGT, R.; GUSTIN, E.; CORNELISSEN, F.; GRAND-PERRET, T.; JANSSEN, L.; VLOEMANS, N.; WUYTS, D.; FRANS, S.; AXEL, A.; PEETERS, P. J.; HALL, B.; CIK, M. Translation of a tumor microenvironment mimicking 3D tumor growth co-culture assay platform to high-content screening. **Journal of Biomolecular Screening**, vol. 18, no. 1, p. 54–66, 2013. DOI 10.1177/1087057112456874.

KROCK, B. L.; SKULI, N.; SIMON, M. C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. **Genes and Cancer**, vol. 2, no. 12, p. 1117–1133, 2011. DOI 10.1177/1947601911423654.

KURTOVA, A. V.; XIAO, J.; MO, Q.; PAZHANISAMY, S.; KRASNOW, R.; LERNER, S. P.; CHEN, F.; ROH, T. T.; LAY, E.; HO, P. L.; CHAN, K. S. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. **Nature**, vol. 517, no. 7533, p. 209–213, 2015. DOI 10.1038/nature14034.

KUTSCHKA, I.; CHEN, I. Y.; KOFIDIS, T.; ARAI, T.; VON DEGENFELD, G.; SHEIKH, A. Y.; HENDRY, S. L.; PEARL, J.; HOYT, G.; SISTA, R.; YANG, P. C.; BLAU, H. M.; GAMBHIR, S. S.; ROBBINS, R. C. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. **Circulation**, vol. 114, no. SUPPL. 1, 2006. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001297.

LAMBERT, B.; DE RIDDER, L.; DE VOS, F.; SLEGERS, G.; DE GELDER, V.; VAN DE WIELE, C.; THIERENS, H. Assessment of supra-additive effects of cytotoxic drugs and low dose rate irradiation in an in vitro model for hepatocellular carcinoma. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 84, no. 10, p. 1121–1128, 2006. DOI 10.1139/Y06-055.

LAMICHHANE, S. P.; ARYA, N.; KOHLER, E.; XIANG, S.; CHRISTENSEN, J.; SHASTRI, V. P. Recapitulating epithelial tumor microenvironment in vitro using three dimensional tri-culture of human epithelial, endothelial, and mesenchymal cells. **BMC Cancer**, vol. 16, no. 1, 2016. DOI 10.1186/s12885-016-2634-1.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Organogenesisin a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. **Science**, vol. 345, no. 6194, 2014. DOI 10.1126/science.1247125.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 9, no. JAN, 2018. DOI 10.3389/fphar.2018.00006.

LANZ, H. L.; SALEH, A.; KRAMER, B.; CAIRNS, J.; NG, C. P.; YU, J.; TRIETSCH, S. J.; HANKEMEIER, T.; JOORE, J.; VULTO, P.; WEINSHILBOUM, R.; WANG, L. Therapy response testing of breast cancer in a 3D high-throughput perfused microfluidic platform. **BMC Cancer**, vol. 17, no. 1, 2017. DOI 10.1186/s12885-017-3709-3.

LARUE, K. E. A.; KHALIL, M.; FREYER, J. P. Microenvironmental Regulation of Proliferation in Multicellular Spheroids Is Mediated through Differential Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. **Cancer Research**, vol. 64, no. 5, p. 1621–1631, 2004. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-2902-2.

LASCHKE, M.; MENGER, M. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. **Trends in Biotechnology**, vol. 35, no. 2, p. 133–144, 2017a. DOI 10.1016/j.tibtech.2016.08.004.

LASCHKE, M.; MENGER, M. D. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, vol. 35, no. 6, p. 782–791, 2017b. DOI 10.1016/j.biotechadv.2017.07.002.

LAURENT, J.; FRONGIA, C.; CAZALES, M.; MONDESERT, O.; DUCOMMUN, B.; LOBJOIS, V. Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. **BMC Cancer**, vol. 13, 2013. DOI 10.1186/1471-2407-13-73.

LEA, M. A.; ALTAYYAR, M.; DESBORDES, C. Inhibition of growth of bladder cancer cells by 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one in combination with other compounds affecting glucose metabolism. **Anticancer Research**, vol. 35, no. 11, p. 5889–5899, 2015. .

LEE, G. Y.; KENNY, P. A.; LEE, E. H.; BISSELL, M. J. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nature Methods**, vol. 4, no. 4, p. 359–365, 2007. DOI 10.1038/nmeth1015.

LEE, J.; LILLY, D.; DOTY, C.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. **Small**, vol. 5, no. 10, p. 1213–1221, 2009. DOI 10.1002/smll.200801788.

LEE, J. M.; PARK, D. Y.; YANG, L.; KIM, E. J.; AHRBERG, C. D.; LEE, K. B.; CHUNG, B. G. Generation of uniform-sized multicellular tumor spheroids using hydrogel microwells for advanced drug screening. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, 2018b. DOI 10.1038/s41598-018-35216-7.

LEE, M.; LEE, J. S. Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. **BMB Reports**, vol. 47, no. 2, p. 51–59, 2014. DOI 10.5483/BMBRep.2014.47.2.005.

LEE, S. A.; NO, D. Y.; KANG, E.; JU, J.; KIM, D. S.; LEE, S. H. Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte-hepatic stellate cell interactions and flow effects. **Lab on a Chip**, vol. 13, no. 18, p. 3529–3537, 2013. DOI 10.1039/c3lc50197c.

LEE, S. H.; HU, W.; MATULAY, J. T.; SILVA, M. V.; OWCZAREK, T. B.; KIM, K.; CHUA, C. W.; BARLOW, L. M. J.; KANDOTH, C.; WILLIAMS, A. B.; BERGREN, S. K.; PIETZAK, E. J.; ANDERSON, C. B.; BENSON, M. C.; COLEMAN, J. A.; TAYLOR, B. S.; ABATE-SHEN, C.; MCKIERNAN, J. M.; AL-AHMADIE, H.; SHEN, M. M. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. **Cell**, vol. 173, no. 2, p. 515–528.e17, 2018a. DOI 10.1016/j.cell.2018.03.017.

LEE, V. K.; DAI, G.; ZOU, H.; YOO, S. S. Generation of 3-D glioblastoma-vascular niche using 3-D bioprinting. 2015. **2015 41st Annual Northeast Biomedical Engineering Conference, NEBEC 2015**, 2015. DOI 10.1109/NEBEC.2015.7117111.

LEEK, R.; GRIMES, D. R.; HARRIS, A. L.; MCINTYRE, A. Methods: Using three-dimensional culture (spheroids) as an in vitro model of tumour hypoxia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 899, p. 167–196, 2016. DOI 10.1007/978-3-319-26666-4_10.

LEUNG, B. M.; LESHER-PEREZ, S. C.; MATSUOKA, T.; MORAES, C.; TAKAYAMA, S. Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. **Biomaterials Science**, vol. 3, no. 2, p. 336–344, 2015. DOI 10.1039/c4bm00319e.

LEWIS, D. M.; BLATCHLEY, M. R.; PARK, K. M.; GERECHT, S. O2-controllable hydrogels for studying cellular responses to hypoxic gradients in three dimensions in vitro and in vivo. **Nature Protocols**, vol. 12, no. 8, p. 1620–1638, 2017. DOI 10.1038/nprot.2017.059.

LEWIS, E. E. L.; WHEADON, H.; LEWIS, N.; YANG, J.; MULLIN, M.; HURSTHOUSE, A.; STIRLING, D.; DALBY, M. J.; BERRY, C. C. A Quiescent, Regeneration-Responsive Tissue Engineered Mesenchymal Stem Cell Bone Marrow Niche Model via Magnetic Levitation. **ACS Nano**, vol. 10, no. 9, p. 8346–8354, 2016. DOI 10.1021/acsnano.6b02841.

LI, C.; ZHAO, S.; ZHAO, Y.; QIAN, Y.; LI, J.; YIN, Y. Chemically crosslinked alginate porous microcarriers modified with bioactive molecule for expansion of human hepatocellular carcinoma cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, vol. 102, no. 8, p. 1648–1658, 2014. DOI 10.1002/jbm.b.33150.

LI, D.; ZHOU, L.; HUANG, J.; XIAO, X. Effect of multidrug resistance 1/P-glycoprotein on the hypoxia-induced multidrug resistance of human laryngeal cancer cells. **Oncology Letters**, vol. 12, no. 2, p. 1569–1574, 2016. DOI 10.3892/ol.2016.4749.

LI, Q.; CHEN, C.; KAPADIA, A.; ZHOU, Q.; HARPER, M. K.; SCHAACK, J.; LABARBERA, D. V. 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: High-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. **Journal of Biomolecular Screening**, vol. 16, no. 2, p. 141–154, 2011. DOI 10.1177/1087057110392995.

LI, Y.; LIN, K.; YANG, Z.; HAN, N.; QUAN, X.; GUO, X.; LI, C. Bladder cancer stem cells: Clonal origin and therapeutic perspectives. **Oncotarget**, vol. 8, no. 39, p. 66668–66679, 2017. DOI 10.18632/oncotarget.19112.

LIANG, X.; XU, X.; WANG, F.; LI, N.; HE, J. E-cadherin increasing multidrug resistance protein 1 via hypoxia-inducible factor-1α contributes to multicellular resistance in colorectal cancer. **Tumor Biology**, vol. 37, no. 1, p. 425–435, 2016. DOI 10.1007/s13277-015-3811-6.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 41, no. 3, p. 211–218, 2016. DOI 10.1016/j.tibs.2015.12.001.

LIM, F.; SUN, A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. **Science**, vol. 210, no. 4472, p. 908–910, 1980. DOI 10.1126/science.6776628.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, vol. 3, no. 9-10, p. 1172–1184, 2008. DOI 10.1002/biot.200700228.

LIN, R. Z.; CHOU, L. F.; CHIEN, C. C. M.; CHANG, H. Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and β1-integrin. **Cell and Tissue Research**, vol. 324, no. 3, p. 411–422, 2006. DOI 10.1007/s00441-005-0148-2.

LIU, H.; TAN, Q.; GEDDIE, W. R.; JEWETT, M. A. S.; PHILLIPS, N.; KE, D.; SIMMONS, C. A.; SUN, Y. Biophysical Characterization of Bladder Cancer Cells with Different Metastatic Potential. **Cell Biochemistry and Biophysics**, vol. 68, no. 2, p. 241–246, 2014. DOI 10.1007/s12013-013-9702-9.

LIU, J.; KUZNETSOVA, L. A.; EDWARDS, G. O.; XU, J.; MA, M.; PURCELL, W. M.; JACKSON, S. K.; COAKLEY, W. T. Functional three-dimensional HepG2 aggregate cultures generated from an ultrasound trap: Comparison with HepG2 spheroids. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 102, no. 5, p. 1180–1189, 2007. https://doi.org/10.1002/jcb.21345.

LIU, J.; ZHANG, C.; HU, W.; FENG, Z. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. **Cancer Letters**, vol. 356, no. 2, p. 197–203, 2015. DOI 10.1016/j.canlet.2013.12.025.

LIU, T.; YAO, R.; PANG, Y.; SUN, W. Review on biofabrication and applications of heterogeneous tumor models. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, vol. 13, no. 11, p. 2101–2120, 2019. DOI 10.1002/term.2949.

LO, U. G.; PONG, R. C.; YANG, D.; GANDEE, L.; HERNANDEZ, E.; DANG, A.; LIN, C. J.; SANTOYO, J.; MA, S.; SONAVANE, R.; HUANG, J.; TSENG, S. F.; MORO, L.; ARBINI, A. A.; KAPUR, P.; RAJ, G. V.; HE, D.; LAI, C. H.; LIN, H.; HSIEH, J. T. IFNG-induced IFIT5 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer via miRNA processing. **Cancer Research**, vol. 79, no. 6, p. 1098–1112, 2019. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-18-2207.

LOBODA, A.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. **Molecules and cells**, vol. 29, no. 5, p. 435–442, 2010. DOI 10.1007/s10059-010-0067-2.

LONGATI, P.; JIA, X.; EIMER, J.; WAGMAN, A.; WITT, M. R.; REHNMARK, S.; VERBEKE, C.; TOFTGÅRD, R.; LÖHR, M.; HEUCHEL, R. L. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. **BMC Cancer**, vol. 13, 2013. DOI 10.1186/1471-2407-13-95.

LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. **Biology**, vol. 3, no. 2, p. 345–367, 2014. DOI 10.3390/biology3020345.

LÜ, W. D.; ZHANG, L.; WU, C. L.; LIU, Z. G.; LEI, G. Y.; LIU, J.; GAO, W.; HU, Y. R. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 7, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0103672.

LUCA, A. C.; MERSCH, S.; DEENEN, R.; SCHMIDT, S.; MESSNER, I.; SCHÄFER, K. L.; BALDUS, S. E.; HUCKENBECK, W.; PIEKORZ, R. P.; KNOEFEL, W. T.; KRIEG, A.; STOECKLEIN, N. H. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 3, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0059689.

LUKER, G. D.; LUKER, K. E. Luciferase Protein Complementation Assays for Bioluminescence Imaging of Cells and Mice. **Methods in Molecular Biology**, n. 680, p. 29–43, 2011. DOI 10.1007/978-1-60761-901-7_2.

MAHMUD, G.; CAMPBELL, C. J.; BISHOP, K. J. M.; KOMAROVA, Y. A.; CHAGA, O.; SOH, S.; HUDA, S.; KANDERE-GRZYBOWSKA, K.; GRZYBOWSKI, B. A. Directing cell motions on micropatterned ratchets. **Nature Physics**, vol. 5, no. 8, p. 606–612, 2009. DOI 10.1038/nphys1306.

MAJETY, M.; PRADEL, L. P.; GIES, M.; RIES, C. H. Fibroblasts influence survival and therapeutic response in a 3D co-culture model. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 6, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0127948.

MAK, I. W. Y.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. **American Journal of Translational Research**, vol. 6, no. 2, p. 114–118, 2014.

MALANEY, P.; NICOSIA, S. V.; DAVÉ, V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. **Cancer Letters**, vol. 344, no. 1, p. 1–12, 2014. DOI 10.1016/j.canlet.2013.10.010.

MANSOORI, B.; MOHAMMADI, A.; DAVUDIAN, S.; SHIRJANG, S.; BARADARAN, B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, vol. 7, no. 3, p. 339–348, 2017. DOI 10.15171/apb.2017.041.

MAR, N.; DAYYANI, F. Management of Urothelial Bladder Cancer in Clinical Practice: Real-World Answers to Difficult Questions. **Journal of Oncology Practice**, vol. 15, no. 8, p. 421–428, 2019. DOI 10.1200/jop.19.00215.

MARBANIANG, C.; KMA, L. Dysregulation of glucose metabolism by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, vol. 19, no. 9, p. 2377–2390, 2018. DOI 10.22034/APJCP.2018.19.9.2377.

MARIA, O. M.; MARIA, O.; LIU, Y.; KOMAROVA, S. V.; TRAN, S. D. Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 43, no. 4, p. 622–631, 2011. DOI 10.1016/j.biocel.2011.01.001.

MARITAN, S. M.; LIAN, E. Y.; MULLIGAN, L. M. An efficient and flexible cell aggregation method for 3D spheroid production. **Journal of Visualized Experiments**, vol. 2017, no. 121, 2017. DOI 10.3791/55544.

MÁRQUEZ, J.; ALONSO, F. J.; MATÉS, J. M.; SEGURA, J. A.; MARTÍN-RUFIÁN, M.; CAMPOS-SANDOVAL, J. A. Glutamine Addiction In Gliomas. **Neurochemical Research**, vol. 42, no. 6, p. 1735–1746, 2017. DOI 10.1007/s11064-017-2212-1.

MARTIN, M. T.; KNUDSEN, T. B.; REIF, D. M.; HOUCK, K. A.; JUDSON, R. S.; KAVLOCK, R. J.; DIX, D. J. Predictive Model of Rat Reproductive Toxicity from ToxCast High Throughput Screening1. **Biology of Reproduction**, vol. 85, no. 2, p. 327–339, 2011. DOI 10.1095/biolreprod.111.090977.

MARTIN, Y.; VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. **Biomaterials**, vol. 26, no. 35, p. 7481–7503, 2005. DOI 10.1016/j.biomaterials.2005.05.057.

MARX, U.; ANDERSSON, T. B.; BAHINSKI, A.; BEILMANN, M.; BEKEN, S.; CASSEE, F. R.; CIRIT, M.; DANESHIAN, M.; FITZPATRICK, S.; FREY, O.; GAERTNER, C.; GIESE, C.; GRIFFITH, L.; HARTUNG, T.; HERINGA, M. B.; HOENG, J.; DE JONG, W. H.; KOJIMA, H.; KUEHNL, J.; ROTH, A. Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. **Altex**, vol. 33, no. 3, p. 272–321, 2016. DOI 10.145/3/aitex.1603161.

MASCHMEYER, I.; LORENZ, A. K.; SCHIMEK, K.; HASENBERG, T.; RAMME, A. P.; HÜBNER, J.; LINDNER, M.; DREWELL, C.; BAUER, S.; THOMAS, A.; SAMBO, N. S.; SONNTAG, F.; LAUSTER, R.; MARX, U. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. **Lab on a Chip**, vol. 15, no. 12, p. 2688–2699, 2015. DOI 10.1039/c5lc00392j.

MASON, B. N.; STARCHENKO, A.; WILLIAMS, R. M.; BONASSAR, L. J.; REINHART-KING, C. A. Tuning three-dimensional collagen matrix stiffness independently of collagen concentration modulates endothelial cell behavior. **Acta Biomaterialia**, vol. 9, no. 1, p. 4635–4644, 2013. DOI 10.1016/j.actbio.2012.08.007.

MASOUD, G. N.; LI, W. HIF-1α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, vol. 5, no. 5, p. 378–389, 2015. DOI 10.1016/j.apsb.2015.05.007.

MASSAGUÉ, J. TGFβ in Cancer. **Cell**, vol. 134, no. 2, p. 215–230, 2008. DOI 10.1016/j.cell.2008.07.001.

MATSUBARA, S.; DING, Q.; MIYAZAKI, Y.; KUWAHATA, T.; TSUKASA, K.; TAKAO, S. MTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions. **Scientific Reports**, vol. 3, 2013. DOI 10.1038/srep03230.

MATSUI, W.; WANG, Q.; BARBER, J. P.; BRENNAN, S.; SMITH, B. D.; BORRELLO, I.; MCNIECE, I.; LIN, L.; AMBINDER, R. F.; PEACOCK, C.; WATKINS, D. N.; HUFF, C. A.; JONES, R. J. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. **Cancer Research**, vol. 68, no. 1, p. 190–197, 2008. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-3096.

MAURER, B. J.; IHNAT, M. A.; MORGAN, C.; PULLMAN, J.; O'BRIEN, C.; JOHNSON, S. W.; RASEY, J. S.; CORNWELL, M. M. Growth of human tumor cells in macroporous microcarriers results in p53- independent, decreased cisplatin sensitivity relative to monolayers. **Molecular Pharmacology**, vol. 55, no. 5, p. 938–947, 1999.

MAYR, L. M.; BOJANIC, D. Novel trends in high-throughput screening. **Current Opinion in Pharmacology**, vol. 9, no. 5, p. 580–588, 2009. DOI 10.1016/j.coph.2009.08.004.

MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: The next future of pharmaco-toxicology and food research? **Genes and Nutrition**, vol. 4, no. 1, p. 13–22, 2009. DOI 10.1007/s12263-008-0107-0.

MCCONKEY, C. A.; DELORME-AXFORD, E.; NICKERSON, C. A.; KIM, K. S.; SADOVSKY, Y.; BOYLE, J. P.; COYNE, C. B. A three-dimensional culture system recapitulates placental syncytiotrophoblast development and microbial resistance. **Science Advances**, vol. 2, no. 3, 2016. DOI 10.1126/sciadv.1501462.

MCCONKEY, D. J.; CHOI, W.; MARQUIS, L.; MARTIN, F.; WILLIAMS, M. B.; SHAH, J.; SVATEK, R.; DAS, A.; ADAM, L.; KAMAT, A.; SIEFKER-RADTKE, A.; DINNEY, C. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, vol. 28, no. 3-4, p. 335–344, 2009. DOI 10.1007/s10555-009-9194-7.

MCKEE, C.; CHAUDHRY, G. R. Advances and challenges in stem cell culture. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 159, p. 62–77, 2017. DOI 10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.

MCMILLIN, D. W.; DELMORE, J.; WEISBERG, E.; NEGRI, J. M.; GEER, D. C.; KLIPPEL, S.; MITSIADES, N.; SCHLOSSMAN, R. L.; MUNSHI, N. C.; KUNG, A. L.; GRIFFIN, J. D.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C.; MITSIADES, C. S. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. **Nature Medicine**, vol. 16, no. 4, p. 483–489, 2010. DOI 10.1038/nm.2112.

MEACHAM, C. E.; MORRISON, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. **Nature**, vol. 501, no. 7467, p. 328–337, 2013. DOI 10.1038/nature12624.

MEHTA, G.; HSIAO, A. Y.; INGRAM, M.; LUKER, G. D.; TAKAYAMA, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**, vol. 164, no. 2, p. 192–204, 2012. DOI 10.1016/j.jconrel.2012.04.045.

MENG, F.; EVANS, J. W.; BHUPATHI, D.; BANICA, M.; LAN, L.; LORENTE, G.; DUAN, J. X.; CAI, X.; MOWDAY, A. M.; GUISE, C. P.; MAROZ, A.; ANDERSON, R. F.; PATTERSON, A. V.; STACHELEK, G. C.; GLAZER, P. M.; MATTEUCCI, M. D.; HART, C. P. Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302. **Molecular Cancer Therapeutics**, vol. 11, no. 3, p. 740–751, 2012. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-11-0634.

MENSHYKAU, D. Emerging technologies for prediction of drug candidate efficacy in the preclinical pipeline. **Drug Discovery Today**, vol. 22, no. 11, p. 1598–1603, 2017. DOI 10.1016/j.drudis.2017.04.019.

MICHELINI, E.; CEVENINI, L.; MEZZANOTTE, L.; COPPA, A.; RODA, A. Cell-based assays: Fuelling drug discovery. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 398, no. 1, p. 227–238, 2010. DOI 10.1007/s00216-010-3933-z.

MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumours. **Nature Reviews Cancer**, vol. 6, no. 8, p. 583–592, 2006. DOI 10.1038/nrc1893.

MISTRY, I. N.; THOMAS, M.; CALDER, E. D. D.; CONWAY, S. J.; HAMMOND, E. M. Clinical Advances of Hypoxia-Activated Prodrugs in Combination With Radiation Therapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, vol. 98, no. 5, p. 1183–1196, 2017. DOI 10.1016/j.ijrobp.2017.03.024.

MITRA, A.; MISHRA, L.; LI, S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. **Trends in Biotechnology**, vol. 31, no. 6, p. 347–354, 2013. DOI 10.1016/j.tibtech.2013.03.006.

MITTLER, F.; OBEÏD, P.; RULINA, A. V.; HAGUET, V.; GIDROL, X.; BALAKIREV, M. Y. High-content monitoring of drug effects in a 3D spheroid model. **Frontiers in Oncology**, vol. 7, no. DEC, 2017. DOI 10.3389/fonc.2017.00293.

MIYOSHI, H.; MAEKAWA, H.; KAKIZAKI, F.; YAMAURA, T.; KAWADA, K.; SAKAI, Y.; TAKETO, M. M. An improved method for culturing patient-derived colorectal cancer spheroids. **Oncotarget**, vol. 9, no. 31, p. 21950–21964, 2018. DOI 10.18632/oncotarget.25134.

MIZUKAMI, A.; PEREIRA CHILIMA, T. D.; ORELLANA, M. D.; NETO, M. A.; COVAS, D. T.; FARID, S. S.; SWIECH, K. Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion: Experimental performance and cost of goods analysis. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 135, p. 36–48, Jul. 2018. DOI 10.1016/j.bej.2018.02.018.

MOHAMED, A.; DENG, X.; KHURI, F. R.; OWONIKOKO, T. K. Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer. **Clinical Lung Cancer**, vol. 15, no. 1, p. 7–15, 2014. DOI 10.1016/j.cllc.2013.09.001.

MONJARET, F.; FERNANDES, M.; DUCHEMIN-PELLETIER, E.; ARGENTO, A.; DEGOT, S.; YOUNG, J. Fully Automated One-Step Production of Functional 3D Tumor Spheroids for High-Content Screening. **Journal of Laboratory Automation**, vol. 21, no. 2, p. 268–280, 2016. DOI 10.1177/2211068215607058.

MONTANEZ-SAURI, S. I.; SUNG, K. E.; BERTHIER, E.; BEEBE, D. J. Enabling screening in 3D microenvironments: Probing matrix and stromal effects on the morphology and proliferation of T47D breast carcinoma cells. **Integrative Biology (United Kingdom)**, vol. 5, no. 3, p. 631–640, 2013. DOI 10.1039/c3ib20225a.

MOSHKSAYAN, K.; KASHANINEJAD, N.; WARKIANI, M. E.; LOCK, J. G.; MOGHADAS, H.; FIROOZABADI, B.; SAIDI, M. S.; NGUYEN, N. T. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, vol. 263, p. 151–176, 2018. DOI 10.1016/j.snb.2018.01.223.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 15, no. 12, p. 771–785, 2014. DOI 10.1038/nrm3902.

MSEKA, T.; BAMBURG, J. R.; CRAMER, L. P. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. **Journal of Cell Science**, vol. 120, no. 24, p. 4332–4344, 2007. DOI 10.1242/jcs.017640.

MUNAZ, A.; VADIVELU, R. K.; ST JOHN, J. A.; NGUYEN, N. T. A lab-on-a-chip device for investigating the fusion process of olfactory ensheathing cell spheroids. **Lab on a Chip**, vol. 16, no. 15, p. 2946–2954, 2016. DOI 10.1039/c6lc00815a.

MUNGAN, N. A.; ABEN, K. K. H.; SCHOENBERG, M. P.; VISSER, O.; COEBERGH, J. W. W.; WITJES, J. A.; KIEMENEY, L. A. L. M. Gender differences in stage-adjusted bladder cancer survival. **Urology**, vol. 55, no. 6, p. 876–880, 2000. DOI 10.1016/S0090-4295(00)00523-9.

MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D Bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, vol. 32, no. 8, p. 773, Aug. 2014. DOI 10.1038/nbt.2958.

MURPHY, K. C.; HUNG, B. P.; BROWNE-BOURNE, S.; ZHOU, D.; YEUNG, J.; GENETOS, D. C.; LEACH, J. K. Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids. **Journal of the Royal Society Interface**, vol. 14, no. 127, p. 20160851, 2017. DOI 10.1098/rsif.2016.0851.

NAGASAWA, N.; MITOMO, H.; YOSHII, F.; KUME, T. Radiation-induced degradation of sodium alginate. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 69, no. 3, p. 279–285, 2000. DOI 10.1016/S0141-3910(00)00070-7.

NAKAO, M.; IMASHIRO, C.; KURIBARA, T.; KURASHINA, Y.; TOTANI, K.; TAKEMURA, K. Formation of Large Scaffold-Free 3-D Aggregates in a Cell Culture Dish by Ultrasound Standing Wave Trapping. **Ultrasound in Medicine and Biology**, vol. 45, no. 5, p. 1306–1315, 2019. DOI 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.01.013.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology and Therapeutics**, vol. 163, p. 94–108, 2016. DOI 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.

NEDERMAN, T.; GLIMELIUS, B.; NORLING, B.; CARLSSON, J.; BRUNK, U. Demonstration of an Extracellular Matrix in Multicellular Tumor Spheroids. **Cancer Research**, vol. 44, no. 7, p. 3090–3097, 1984.

NERVI, C.; DE MARINIS, E.; CODACCI-PISANELLI, G. Epigenetic treatment of solid tumours: A review of clinical trials. **Clinical Epigenetics**, vol. 7, no. 1, 2015. DOI 10.1186/s13148-015-0157-2.

NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. **Pharmacogenomics**, vol. 16, no. 3, p. 273–285, 2015. DOI 10.2217/pgs.14.170.

NUNES, A. S.; BARROS, A. S.; COSTA, E. C.; MOREIRA, A. F.; CORREIA, I. J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 116, no. 1, p. 206–226, Jan. 2019. DOI 10.1002/bit.26845.

OJHA, R.; JHA, V.; SINGH, S. K.; BHATTACHARYYA, S. Autophagy inhibition suppresses the tumorigenic potential of cancer stem cell enriched side population in bladder cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, vol. 1842, no. 11, p. 2073–2086, 2014. DOI 10.1016/j.bbadis.2014.07.007.

OLIVEIRA, M. S.; ARYASOMAYAJULA, B.; PATTNI, B.; MUSSI, S. V.; FERREIRA, L. A. M.; TORCHILIN, V. P. Solid lipid nanoparticles co-loaded with doxorubicin and α-tocopherol succinate are effective against drug-resistant cancer cells in monolayer and 3-D spheroid cancer cell models. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 512, no. 1, p. 292–300, 2016. DOI 10.1016/j.ijpharm.2016.08.049.

OLOFSSON, K.; CARANNANTE, V.; OHLIN, M.; FRISK, T.; KUSHIRO, K.; TAKAI, M.; LUNDQVIST, A.; ÖNFELT, B.; WIKLUND, M. Acoustic formation of multicellular tumor spheroids enabling on-chip functional and structural imaging. **Lab on a Chip**, vol. 18, no. 16, p. 2466–2476, 2018. DOI 10.1039/c8lc00537k.

ORGEL, J. P. R. O.; PERSIKOV, A. V.; ANTIPOVA, O. Variation in the helical structure of native collagen. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 2, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0089519.

ORTIZ, A.; GONZALEZ-PARRA, E.; ALVAREZ-COSTA, G.; EGIDO, J. Bladder cancer after cyclophosphamide therapy for lupus nephritis [10]. **Nephron**, vol. 60, no. 3, p. 378–379, 1992. DOI 10.1159/000186790.

OSTRAND-ROSENBERG, S. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. **Current Opinion in Immunology**, vol. 16, no. 2, p. 143–150, 2004. DOI 10.1016/j.coi.2004.01.003.

OWEN, J. H.; GRAHAM, M. P.; CHINN, S. B.; DARR, O. F.; CHEPEHA, D. B.; WOLF, G. T.; BRADFORD, C. R.; CAREY, T. E.; PRINCE, M. E. P. Novel method of cell line establishment utilizing fluorescence-activated cell sorting resulting in 6 new head and neck squamous cell carcinoma lines. **Head and Neck**, vol. 38, p. E459–E467, 2016. DOI 10.1002/hed.24019.

PALLADINI, A.; NICOLETTI, G.; PAPPALARDO, F.; MURGO, A.; GROSSO, V.; STIVANI, V.; IANZANO, M. L.; ANTOGNOLI, A.; CROCI, S.; LANDUZZI, L.; DE GIOVANNI, C.; NANNI, P.; MOTTA, S.; LOLLINI, P. L. In silico modeling and in vivo efficacy of cancer-preventive vaccinations. **Cancer Research**, vol. 70, no. 20, p. 7755–7763, 2010. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-10-0701.

PALMER, S.; LITVINOVA, K.; DUNAEV, A.; FLEMING, S.; MCGLOIN, D.; NABI, G. Changes in autofluorescence based organoid model of muscle invasive urinary bladder cancer. **Biomedical Optics Express**, vol. 7, no. 4, p. 1193, 2016. DOI 10.1364/boe.7.001193.

PAMIES, D.; HARTUNG, T.; HOGBERG, H. T. Biological and medical applications of a brain-on-a-chip. **Experimental Biology and Medicine**, vol. 239, no. 9, p. 1096–1107, 2014. DOI 10.1177/1535370214537738.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 8, no. 10, p. 839–845, 2007. DOI 10.1038/nrm2236.

PAN, C. X.; ZHANG, H.; TEPPER, C. G.; LIN, T. Y.; DAVIS, R. R.; KECK, J.; GHOSH, P. M.; GILL, P.; AIRHART, S.; BULT, C.; GANDARA, D. R.; LIU, E.; DE VERE WHITE, R. W. Development and characterization of bladder cancer patient-derived xenografts for molecularly guided targeted therapy. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 8, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0134346.

PAN, W.; CHEN, W.; JIANG, X. Microfluidic western blot. **Analytical Chemistry**, vol. 82, no. 10, p. 3974–3976, 2010. DOI 10.1021/ac1000493.

PAN, Y.; HU, N.; WEI, X.; GONG, L.; ZHANG, B.; WAN, H.; WANG, P. 3D cell-based biosensor for cell viability and drug assessment by 3D electric cell/matrigel-substrate impedance sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 130, no. August, p. 344–351, 2019. DOI 10.1016/j.bios.2018.09.046.

PASCHOS, N. K.; BROWN, W. E.; ESWARAMOORTHY, R.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. A. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, vol. 9, no. 5, p. 488–503, 2015. DOI 10.1002/term.1870.

PATEL, D.; GAO, Y.; SON, K.; SILTANEN, C.; NEVE, R. M.; FERRARA, K.; REVZIN, A. Microfluidic co-cultures with hydrogel-based ligand trap to study paracrine signals giving rise to cancer drug resistance. **Lab on a Chip**, vol. 15, no. 24, p. 4614–4624, 2015. DOI 10.1039/c5lc00948k.

PATRA, B.; CHEN, Y. H.; PENG, C. C.; LIN, S. C.; LEE, C. H.; TUNG, Y. C. A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis. **Biomicrofluidics**, vol. 7, no. 5, 2013. DOI 10.1063/1.4824480.

PATRA, B.; PENG, C. C.; LIAO, W. H.; LEE, C. H.; TUNG, Y. C. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. **Scientific Reports**, vol. 6, 2016. DOI 10.1038/srep21061.

PAULI, C.; HOPKINS, B. D.; PRANDI, D.; SHAW, R.; FEDRIZZI, T.; SBONER, A.; SAILER, V.; AUGELLO, M.; PUCA, L.; ROSATI, R.; MCNARY, T. J.; CHURAKOVA, Y.; CHEUNG, C.; TRISCOTT, J.; PISAPIA, D.; RAO, R.; MOSQUERA, J. M.; ROBINSON, B.; FALTAS, B. M.; RUBIN, M. A. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine. **Cancer Discovery**, vol. 7, no. 5, p. 462–477, 2017. DOI 10.1158/2159-8290.CD-16-1154.

PEARCE, M. C.; GAMBLE, J. T.; KOPPARAPU, P. R.; O'DONNELL, E. F.; MUELLER, M. J.; JANG, H. S.; GREENWOOD, J. A.; SATTERTHWAIT, A. C.; TANGUAY, R. L.; ZHANG, X.-K.; KOLLURI, S. K. Induction of apoptosis and suppression of tumor growth by Nur77-derived Bcl-2 converting peptide in chemoresistant lung cancer cells. **Oncotarget**, vol. 9, no. 40, 2018. DOI 10.18632/oncotarget.25437.

PEEK, E. M.; LI, D. R.; ZHANG, H.; KIM, H. P.; ZHANG, B.; GARRAWAY, I. P.; CHIN, A. I. Stromal modulation of bladder cancer-initiating cells in a subcutaneous tumor model. **American journal of cancer research**, vol. 2, no. 6, p. 745–51, 2012.

PEREIRA, P. M. R.; BERISHA, N.; BHUPATHIRAJU, N. V. S. D. K.; FERNANDES, R.; TOMÉ, J. P. C.; DRAIN, C. M. Cancer cell spheroids are a better screen for the photodynamic efficiency of glycosylated photosensitizers. **PLoS ONE**, vol. 12, no. 5, 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0177737.

PETRIDOU, N. I.; SPIRÓ, Z.; HEISENBERG, C. P. Multiscale force sensing in development. **Nature Cell Biology**, vol. 19, no. 6, p. 581–588, 2017. DOI 10.1038/ncb3524.

PHAN, L. M.; YEUNG, S. C. J.; LEE, M. H. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. **Cancer Biology and Medicine**, vol. 11, no. 1, p. 1–19, 2014. DOI 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001.

PICCININI, F. AnaSP: A software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, vol. 119, no. 1, p. 43–52, 2015. DOI 10.1016/j.cmpb.2015.02.006.

PICKL, M.; RIES, C. H. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. **Oncogene**, vol. 28, no. 3, p. 461–468, 2009. DOI 10.1038/onc.2008.394.

PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, vol. 15, no. 12, p. 1243–1253, 2014. DOI 10.15252/embr.201439246.

POLLACK, A.; CZERNIAK, B.; ZAGARS, G. K.; HU, S. X.; WU, C. S.; DINNEY, C. P. N.; CHYLE, V.; BENEDICT, W. F. Retinoblastoma protein expression and radiation response in muscle- invasive bladder cancer. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, vol. 39, no. 3, p. 687–695, 1997. DOI 10.1016/S0360-3016(97)00147-8.

POULIN, P.; CHEN, Y. H.; DING, X.; GOULD, S. E.; HOP, C. E.; MESSICK, K.; OEH, J.; LIEDERER, B. M. Prediction of Drug Distribution in Subcutaneous Xenografts of Human Tumor Cell Lines and Healthy Tissues in Mouse: Application of the Tissue Composition-Based Model to Antineoplastic Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 104, no. 4, p. 1508–1521, 2015. DOI 10.1002/jps.24336.

PRESTWICH, G. D. Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: Using synthetic extracellular matrices in drug discovery. **Accounts of Chemical Research**, vol. 41, no. 1, p. 139–148, 2008. DOI 10.1021/ar7000827.

PRICE, K. J.; TSYKIN, A.; GILES, K. M.; SLADIC, R. T.; EPIS, M. R.; GANSS, R.; GOODALL, G. J.; LEEDMAN, P. J. Matrigel Basement Membrane Matrix influences expression of microRNAs in cancer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 427, no. 2, p. 343–348, 2012. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.09.059.

PÜTZER, B. M.; SOLANKI, M.; HERCHENRÖDER, O. Advances in cancer stem cell targeting: How to strike the evil at its root. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 120, p. 89–107, 2017. DOI 10.1016/j.addr.2017.07.013.

QIN, Y.; ROSZIK, J.; CHATTOPADHYAY, C.; HASHIMOTO, Y.; LIU, C.; COOPER, Z. A.; WARGO, J. A.; HWU, P.; EKMEKCIOGLU, S.; GRIMM, E. A. Hypoxia-driven mechanism of vemurafenib resistance in melanoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, vol. 15, no. 10, p. 2442–2454, 2016. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-15-0963.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, vol. 19, no. 11, p. 1423–1437, 2013. DOI 10.1038/nm.3394.

RABIONET, M.; YESTE, M.; PUIG, T.; CIURANA, J. Electrospinning PCL scaffolds manufacture for three-dimensional breast cancer cell culture. **Polymers**, vol. 9, no. 8, 2017. DOI 10.3390/polym9080328.

RAGHAVAN, S.; WARD, M. R.; ROWLEY, K. R.; WOLD, R. M.; TAKAYAMA, S.; BUCKANOVICH, R. J.; MEHTA, G. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. **Gynecologic Oncology**, vol. 138, no. 1, p. 181–189, 2015. DOI 10.1016/j.ygyno.2015.04.014.

RAGO, A. P.; NAPOLITANO, A. P.; DEAN, D. M.; CHAI, P. R.; MORGAN, J. R. Miniaturization of an Anoikis assay using non-adhesive micromolded hydrogels. **Cytotechnology**, vol. 56, no. 2, p. 81–90, 2008. DOI 10.1007/s10616-007-9116-x.

RAMACHANDRAN, S. D.; SCHIRMER, K.; MÜNST, B.; HEINZ, S.; GHAFOORY, S.; WÖLFL, S.; SIMON-KELLER, K.; MARX, A.; OIE, C. I.; EBERT, M. P.; WALLES, H.; BRASPENNING, J.; BREITKOPF-HEINLEIN, K. In vitro generation of functional liver organoid-like structures using adult human cells. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 10, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0139345.

RAMME, A. P.; KOENIG, L.; HASENBERG, T.; SCHWENK, C.; MAGAUER, C.; FAUST, D.; LORENZ, A. K.; KREBS, A. C.; DREWELL, C.; SCHIRRMANN, K.; VLADETIC, A.; LIN, G. C.; PABINGER, S.; NEUHAUS, W.; BOIS, F.; LAUSTER, R.; MARX, U.; DEHNE, E. M. Autologous induced pluripotent stem cell-derived four-organ-chip. **Future Science OA**, vol. 5, no. 8, 2019. DOI 10.2144/fsoa-2019-0065.

RASSY, E.; BAKOUNY, Z.; CHOUEIRI, T. K.; VAN ALLEN, E. M.; FIZAZI, K.; GRECO, F. A.; PAVLIDIS, N. The role of site-specific therapy for cancers of unknown of primary: A meta-analysis. **European Journal of Cancer**, vol. 127, p. 118–122, 2020. DOI 10.1016/j.ejca.2019.12.016.

REBELO, S. P.; COSTA, R.; SILVA, M. M.; MARCELINO, P.; BRITO, C.; ALVES, P. M. Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: improved functionality in long-term bioreactor cultures. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, vol. 11, no. 7, p. 2034–2045, 2017. DOI 10.1002/term.2099.

REID, B. G.; JERJIAN, T.; PATEL, P.; ZHOU, Q.; YOO, B. H.; KABOS, P.; SARTORIUS, C. A.; LABARBERA, D. V. Live Multicellular Tumor Spheroid Models For High-Content Imaging and Screening In Cancer Drug Discovery. **Current Chemical Genomics and Translational Medicine**, vol. 8, no. 1, p. 27–35, 2014. DOI 10.2174/2213988501408010027.

REID, B. M.; PERMUTH, J. B.; SELLERS, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer Biology and Medicine**, vol. 14, no. 1, p. 9–32, 2017. DOI 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084.

RICCI, C.; MORONI, L.; DANTI, S. Cancer tissue engineering − new perspectives in understanding the biology of solid tumours − a critical review. **OA Tissue Engineering**, vol. 1, no. 1, 2013. DOI 10.13172/2052-9643-1-1-607.

RIFFLE, S.; HEGDE, R. S. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, vol. 36, no. 1, 2017. DOI 10.1186/s13046-017-0570-9.

RIFFLE, S.; PANDEY, R. N.; ALBERT, M.; HEGDE, R. S. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. **BMC Cancer**, vol. 17, no. 1, 2017. DOI 10.1186/s12885-017-3319-0.

RINGUETTE GOULET, C.; BERNARD, G.; CHABAUD, S.; COUTURE, A.; LANGLOIS, A.; NEVEU, B.; POULIOT, F.; BOLDUC, S. Tissue-engineered human 3D model of bladder cancer for invasion study and drug discovery. **Biomaterials**, vol. 145, p. 233–241, 2017. DOI 10.1016/j.biomaterials.2017.08.041.

RINGUETTE-GOULET, C.; BOLDUC, S.; POULIOT, F. Modeling human bladder cancer. **World Journal of Urology**, vol. 36, no. 11, p. 1759–1766, 2018. DOI 10.1007/s00345-018-2369-5.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, no. Md, p. 1–25, 2013. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433.

ROBERTSON, F. M.; OGASAWARA, M. A.; ZAIMING YE; CHU, K.; PICKEI, R.; DEBEB, B. G.; WOODWARD, W. A.; HITTELMAN, W. N.; CRISTOFANILLI, M.; BARSKY, S. H. Imaging and analysis of 3D tumor spheroids enriched for a cancer stem cell phenotype. **Journal of Biomolecular Screening**, vol. 15, no. 7, p. 820–829, 2010. DOI 10.1177/1087057110376541.

RODENHIZER, D.; GAUDE, E.; COJOCARI, D.; MAHADEVAN, R.; FREZZA, C.; WOUTERS, B. G.; MCGUIGAN, A. P. A three-dimensional engineered tumour for spatial snapshot analysis of cell metabolism and phenotype in hypoxic gradients. **Nature Materials**, vol. 15, no. 2, p. 227–234, 2016. DOI 10.1038/nmat4482.

ROH, Y. G.; MUN, M. H.; JEONG, M. S.; KIM, W. T.; LEE, S. R.; CHUNG, J. W.; KIM, S. Il; KIM, T. N.; NAM, J. K.; LEEM, S. H. Drug resistance of bladder cancer cells through activation of ABCG2 by FOXM1. **BMB Reports**, vol. 51, no. 2, p. 98–103, 2018. DOI 10.5483/BMBRep.2018.51.2.222.

ROHWER, N.; CRAMER, T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. **Drug Resistance Updates**, vol. 14, no. 3, p. 191–201, 2011. DOI 10.1016/j.drup.2011.03.001.

ROSA, R.; D'AMATO, V.; DE PLACIDO, S.; BIANCO, R. Approaches for targeting cancer stem cells drug resistance. **Expert Opinion on Drug Discovery**, vol. 11, no. 12, p. 1201–1212, 2016. DOI 10.1080/17460441.2016.1243525.

RUPPEN, J.; CORTES-DERICKS, L.; MARCONI, E.; KAROUBI, G.; SCHMID, R. A.; PENG, R.; MARTI, T. M.; GUENAT, O. T. A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. **Lab on a Chip**, vol. 14, no. 6, p. 1198–1205, 2014. DOI 10.1039/c3lc51093j.

SACHS, N.; DE LIGT, J.; KOPPER, O.; GOGOLA, E.; BOUNOVA, G.; WEEBER, F.; BALGOBIND, A. V.; WIND, K.; GRACANIN, A.; BEGTHEL, H.; KORVING, J.; VAN BOXTEL, R.; DUARTE, A. A.; LELIEVELD, D.; VAN HOECK, A.; ERNST, R. F.; BLOKZIJL, F.; NIJMAN, I. J.; HOOGSTRAAT, M.; … CLEVERS, H. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. **Cell**, vol. 172, no. 1-2, p. 373–386.e10, 2018. DOI 10.1016/j.cell.2017.11.010.

SAGGAR, J. K.; YU, M.; TAN, Q.; TANNOCK, I. F. The tumor microenvironment and strategies to improve drug distribution. **Frontiers in Oncology**, vol. 3 JUN, 2013. DOI 10.3389/fonc.2013.00154.

SAINI, S.; WICK, T. M. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: Effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development. **Biotechnology Progress**, vol. 19, no. 2, p. 510–521, 2003. DOI 10.1021/bp0256519.

SANLI, O.; DOBRUCH, J.; KNOWLES, M. A.; BURGER, M.; ALEMOZAFFAR, M.; NIELSEN, M. E.; LOTAN, Y. Bladder cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, vol. 3, 2017. DOI 10.1038/nrdp.2017.22.

SANT, S.; JOHNSTON, P. A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, vol. 23, p. 27–36, 2017. DOI 10.1016/j.ddtec.2017.03.002.

SANTO, V. E.; ESTRADA, M. F.; REBELO, S. P.; ABREU, S.; SILVA, I.; PINTO, C.; VELOSO, S. C.; SERRA, A. T.; BOGHAERT, E.; ALVES, P. M.; BRITO, C. Adaptable stirred-tank culture strategies for large scale production of multicellular spheroid-based tumor cell models. **Journal of Biotechnology**, vol. 221, p. 118–129, 2016. DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.01.031.

SARIOGLU, A. F.; ACETO, N.; KOJIC, N.; DONALDSON, M. C.; ZEINALI, M.; HAMZA, B.; ENGSTROM, A.; ZHU, H.; SUNDARESAN, T. K.; MIYAMOTO, D. T.; LUO, X.; BARDIA, A.; WITTNER, B. S.; RAMASWAMY, S.; SHIODA, T.; TING, D. T.; STOTT, S. L.; KAPUR, R.; MAHESWARAN, S.; TONER, M. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. **Nature Methods**, vol. 12, no. 7, p. 685–691, 2015. DOI 10.1038/nmeth.3404.

SART; TSAI, A. C.; LI, Y.; MA, T. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Celullar Mechanisms, Biological Properties, and Applications. **Tissue Engineering: Part B**, vol. 20, no. 5, p. 365–380, 2014a. DOI 10.1089/ten.teb.2013.0537.

SART, S.; TSAI, A.-C.; LI, Y.; MA, T. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, vol. 20, no. 5, p. 365–380, Oct. 2014b. DOI 10.1089/ten.teb.2013.0537.

SASSELLI, V.; BLOKZIJL, F.; DROST, J.; NIK-ZAINAL, S.; SASAKI, N.; CLEVERS, H.; VAN WEZEL, T.; CUPPEN, E.; BEHJATI, S.; DE LIGT, J.; MIZUTANI, T.; VAN BOXTEL, R.; KUIPER, R. P.; GROLLEMAN, J. E. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. **Science**, vol. 358, no. 6360, p. 234–238, 2017. DOI 10.1126/science.aao3130.

SATHAYE, S.; MBI, A.; SONMEZ, C.; CHEN, Y.; BLAIR, D. L.; SCHNEIDER, J. P.; POCHAN, D. J. Rheology of peptide- and protein-based physical hydrogels: Are everyday measurements just scratching the surface? **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, vol. 7, no. 1, p. 34–68, 2015. DOI 10.1002/wnan.1299.

SCHERER, W. F.; SYVERTON, J. T.; GEY, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 97, no. 5, p. 695–710, 1953. DOI 10.1084/jem.97.5.695.

SCHMIDT, M.; SCHOLZ, C. J.; POLEDNIK, C.; ROLLER, J. Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer. **Oncology Reports**, vol. 35, no. 4, p. 2431–2440, 2016. DOI 10.3892/or.2016.4581.

SERRA, T.; MATEOS-TIMONEDA, M. A.; PLANELL, J. A.; NAVARRO, M. 3D printed PLA-based scaffolds: A versatile tool in regenerative medicine. **Organogenesis**, vol. 9, no. 4, p. 239–244, 2013. DOI 10.4161/org.26048.

SFRISO, R.; RIEBEN, R. 3D cell-culture models for the assessment of anticoagulant and anti-inflammatory properties of endothelial cells. **Methods in Molecular Biology**, vol. 2110, p. 83–97, 2020. DOI 10.1007/978-1-0716-0255-3_6.

SHAH, S. B.; SINGH, A. Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases. **Acta Biomaterialia**, vol. 53, p. 29–45, 2017. DOI 10.1016/j.actbio.2017.01.075.

SHAHEEN, S.; AHMED, M.; LORENZI, F.; NATERI, A. S. Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. **Stem Cell Reviews and Reports**, vol. 12, no. 4, p. 492–499, 2016. DOI 10.1007/s12015-016-9664-6.

SHARMA, S. V.; HABER, D. A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, vol. 10, no. 4, p. 241–253, 2010. DOI 10.1038/nrc2820.

SHI, W.; KWON, J.; HUANG, Y.; TAN, J.; UHL, C. G.; HE, R.; ZHOU, C.; LIU, Y. Facile tumor spheroids formation in large quantity with controllable size and high uniformity. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, p. 1–9, 2018. DOI 10.1038/s41598-018-25203-3.

SHIELD, K.; ACKLAND, M. L.; AHMED, N.; RICE, G. E. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. **Gynecologic Oncology**, vol. 113, no. 1, p. 143–148, 2009. DOI 10.1016/j.ygyno.2008.11.032.

SHIMAZUI, T.; SCHALKEN, J. A.; KAWAI, K.; KAWAMOTO, R.; VAN BOCKHOVEN, A.; OOSTERWIJK, E.; AKAZA, H. Role of complex cadherins in cell-cell adhesion evaluated by spheroid formation in renal cell carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, vol. 11, no. 2, p. 357–360, 2004. DOI 10.3892/or.11.2.357.

SHIN, D. H.; DIER, U.; MELENDEZ, J. A.; HEMPEL, N. Regulation of MMP-1 expression in response to hypoxia is dependent on the intracellular redox status of metastatic bladder cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, vol. 1852, no. 12, p. 2593–2602, 2015. DOI 10.1016/j.bbadis.2015.09.001.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. 6., 2006. **Nature Reviews Cancer**, vol. 6, p. 813–8232006. DOI 10.1038/nrc1951.

SHRI, M.; AGRAWAL, H.; RANI, P.; SINGH, D.; ONTERU, S. K. Hanging drop, a best three-dimensional (3D) culture method for primary buffalo and sheep hepatocytes. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-01355-6.

SHULTZ, L. D.; ISHIKAWA, F.; GREINER, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. **Nature Reviews Immunology**, vol. 7, no. 2, p. 118–130, 2007. DOI 10.1038/nri2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 68, no. 1, p. 7–30, 2018. DOI 10.3322/caac.21442.

SILVA, J. M.; GARCÍA, J. R.; REIS, R. L.; GARCÍA, A. J.; MANO, J. F. Tuning cell adhesive properties via layer-by-layer assembly of chitosan and alginate. **Acta Biomaterialia**, vol. 51, p. 279–293, 2017. DOI 10.1016/j.actbio.2017.01.058.

SILVERMAN, D. T.; HARTGE, P.; MORRISON, A. S.; DEVESA, S. S. Epidemiology of bladder cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, vol. 6, no. 1, p. 1–30, 1992. DOI 10.1159/000424538.

SIMAÕ, D.; AREZ, F.; TERASSO, A. P.; PINTO, C.; SOUSA, M. F. Q.; BRITO, C.; ALVES, P. M. Perfusion stirred-tank bioreactors for 3D differentiation of human neural stem cells. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1502, p. 129–142, 2016. DOI 10.1007/7651_2016_333.

SINGH, S.; SHARMA, B.; KANWAR, S. S.; KUMAR, A. Lead phytochemicals for anticancer drug development. **Frontiers in Plant Science**, vol. 7, no. November 2016, 2016. DOI 10.3389/fpls.2016.01667.

SIOLAS, D.; HANNON, G. J. Patient-derived tumor xenografts: Transforming clinical samples into mouse models. **Cancer Research**, vol. 73, no. 17, p. 5315–5319, 2013. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-13-1069.

SIRENKO, O.; MITLO, T.; HESLEY, J.; LUKE, S.; OWENS, W.; CROMWELL, E. F. High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. **Assay and Drug Development Technologies**, vol. 13, no. 7, p. 402–414, 2015. DOI 10.1089/adt.2015.655.

SMITH, H. A.; KANG, Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. **Journal of Molecular Medicine**, vol. 91, no. 4, p. 411–429, 2013. DOI 10.1007/s00109-013-1021-5.

SMYREK, I.; MATHEW, B.; FISCHER, S. C.; LISSEK, S. M.; BECKER, S.; STELZER, E. H. K. E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. **Biology Open**, vol. 8, no. 1, 2019. DOI 10.1242/bio.037051.

SMYREK, I.; STELZER, E. H. K. Quantitative three-dimensional evaluation of immunofluorescence staining for large whole mount spheroids with light sheet microscopy. **Biomedical Optics Express**, vol. 8, no. 2, p. 484, 2017. DOI 10.1364/boe.8.000484.

SONG, Y.; KIM, J. S.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; YU, E.; KIM, K. H.; SEO, E. J.; OH, H. B.; LEE, H. C.; KIM, K. M.; SEO, H. R. Patient-derived multicellular tumor spheroids towards optimized treatment for patients with hepatocellular carcinoma. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, vol. 37, no. 1, 2018. DOI 10.1186/s13046-018-0752-0.

SONODA, T.; KOBAYASHI, H.; KAKU, T.; HIRAKAWA, T.; NAKANO, H. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. **Cancer Letters**, vol. 196, no. 2, p. 229–237, 2003. DOI 10.1016/S0304-3835(03)00216-7.

SOTIROPOULOU, P. A.; CANDI, A.; MASCRÉ, G.; DE CLERCQ, S.; YOUSSEF, K. K.; LAPOUGE, G.; DAHL, E.; SEMERARO, C.; DENECKER, G.; MARINE, J. C.; BLANPAIN, C. Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death. **Nature Cell Biology**, vol. 12, no. 6, p. 572–582, 2010. DOI 10.1038/ncb2059.

SOUCY, P. A.; ROMER, L. H. Endothelial cell adhesion, signaling, and morphogenesis in fibroblast-derived matrix. **Matrix Biology**, vol. 28, no. 5, p. 273–283, 2009. DOI 10.1016/j.matbio.2009.04.005.

SOURLA, A.; DOILLON, C.; KOUTSILIERIS, M. Three-dimensional type I collagen gel system containing MG-63 osteoblasts-like cells as a model for studying local bone reaction caused by metastatic cancer cells. **Anticancer Research**, vol. 16, no. 5 A, p. 2773–2780, 1996.

SOUZA, G. R.; MOLINA, J. R.; RAPHAEL, R. M.; OZAWA, M. G.; STARK, D. J.; LEVIN, C. S.; BRONK, L. F.; ANANTA, J. S.; MANDELIN, J.; GEORGESCU, M. M.; BANKSON, J. A.; GELOVANI, J. G.; KILLIAN, T. C.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, vol. 5, no. 4, p. 291–296, 2010. DOI 10.1038/nnano.2010.23.

SPILL, F.; REYNOLDS, D. S.; KAMM, R. D.; ZAMAN, M. H. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 40, p. 41–48, 2016. DOI 10.1016/j.copbio.2016.02.007.

SPIRIDON, C. I.; GHETIE, M. A.; UHR, J.; MARCHES, R.; LI, J. L.; SHEN, G. L.; VITETTA, E. S. Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research**, vol. 8, no. 6, p. 1720–1730, 2002.

STADLER, M.; WALTER, S.; WALZL, A.; KRAMER, N.; UNGER, C.; SCHERZER, M.; UNTERLEUTHNER, D.; HENGSTSCHLÄGER, M.; KRUPITZA, G.; DOLZNIG, H. Increased complexity in carcinomas: Analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 35, p. 107–124, 2015. DOI 10.1016/j.semcancer.2015.08.007.

STEPHENS, P. J.; GREENMAN, C. D.; FU, B.; YANG, F.; BIGNELL, G. R.; MUDIE, L. J.; PLEASANCE, E. D.; LAU, K. W.; BEARE, D.; STEBBINGS, L. A.; MCLAREN, S.; LIN, M. L.; MCBRIDE, D. J.; VARELA, I.; NIK-ZAINAL, S.; LEROY, C.; JIA, M.; MENZIES, A.; BUTLER, A. P.; … CAMPBELL, P. J. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, vol. 144, no. 1, p. 27–40, 2011. DOI 10.1016/j.cell.2010.11.055.

STOCK, K.; ESTRADA, M. F.; VIDIC, S.; GJERDE, K.; RUDISCH, A.; SANTO, V. E.; BARBIER, M.; BLOM, S.; ARUNDKAR, S. C.; SELVAM, I.; OSSWALD, A.; STEIN, Y.; GRUENEWALD, S.; BRITO, C.; VAN WEERDEN, W.; ROTTER, V.; BOGHAERT, E.; OREN, M.; SOMMERGRUBER, W.; … GRAESER, R. Capturing tumor complexity in vitro: Comparative analysis of 2D and 3D tumor models for drug discovery. **Scientific Reports**, vol. 6, 2016. DOI 10.1038/srep28951.

STOJNEV, S.; KRSTIĆ, M.; KOKORIS, J. Č.; CONIĆ, I.; PETKOVIĆ, I.; ILIĆ, S.; MILOSEVIĆ-STEVANOVIĆ, J.; VELIČKOVIĆ, L. J. Prognostic impact of canonical TGF-β signaling in urothelial bladder cancer. **Medicina (Lithuania)**, vol. 55, no. 6, 2019. DOI 10.3390/medicina55060302.

STORCH, K.; EKE, I.; BORGMANN, K.; KRAUSE, M.; RICHTER, C.; BECKER, K.; SCHRÖCK, E.; CORDES, N. Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. **Cancer Research**, vol. 70, no. 10, p. 3925–3934, 2010. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-09-3848.

STUART, M. P.; MATSUI, R. A. M.; SANTOS, M. F. S.; CÔRTES, I.; AZEVEDO, M. S.; SILVA, K. R.; BEATRICI, A.; LEITE, P. E. C.; FALAGAN-LOTSCH, P.; GRANJEIRO, J. M.; MIRONOV, V.; BAPTISTA, L. S. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. **Stem Cells International**, no. 7053465, p. 1–11, 2017. DOI 10.1155/2017/7053465.

SULTANA, N.; HASSAN, M. I.; LIM, M. M. Scaffold Fabrication Protocols. **SpringerBriefs in Materials**, p. 13–24, 2015. DOI 10.1007/978-3-319-09755-8_2.

SUN, L. Y.; LIN, S. Z.; LI, Y. S.; HARN, H. J.; CHIOU, T. W. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research. **Cell Transplantation**, vol. 20, no. 1, p. 49–62, 2011. DOI 10.3727/096368910X532792.

SUN, Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. **Cancer Letters**, vol. 380, no. 1, p. 205–215, 2016. DOI 10.1016/j.canlet.2015.07.044.

SUTHERLAND, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. **Science**, vol. 240, no. 4849, p. 177–184, 1988. DOI 10.1126/science.2451290.

SUTHERLAND, R. M.; MCCREDIE, J. A.; INCH, W. R. Growth of multicell spheroids as a model of nodular carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 46, no. 1, p. 113–120, 1971. DOI 10.1093/jnci/46.1.113.

SWIETACH, P.; WIGFIELD, S.; COBDEN, P.; SUPURAN, C. T.; HARRIS, A. L.; VAUGHAN-JONES, R. D. Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 283, no. 29, p. 20473–20483, 2008. DOI 10.1074/jbc.M801330200.

SYLVESTER, R. J.; VAN DER MEIJDEN, A. P. M.; OOSTERLINCK, W.; WITJES, J. A.; BOUFFIOUX, C.; DENIS, L.; NEWLING, D. W. W.; KURTH, K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: A combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. **European Urology**, vol. 49, no. 3, p. 466–477, 2006. DOI 10.1016/j.eururo.2005.12.031.

SZYMAŃSKI, P.; MARKOWICZ, M.; MIKICIUK-OLASIK, E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 13, no. 1, p. 427–452, 2012. DOI 10.3390/ijms13010427.

TAKEI, R.; SUZUKI, D.; HOSHIBA, T.; NAGAOKA, M.; SEO, S. J.; CHO, C. S.; AKAIKE, T. Role of E-cadherin molecules in spheroid formation of hepatocytes adhered on galactose-carrying polymer as an artificial asialoglycoprotein model. **Biotechnology Letters**, vol. 27, no. 16, p. 1149–1156, 2005. DOI 10.1007/s10529-005-8652-8.

TANCIONI, I.; MILLER, N. L. G.; URYU, S.; LAWSON, C.; JEAN, C.; CHEN, X. L.; KLEINSCHMIDT, E. G.; SCHLAEPFER, D. D. FAK activity protects nucleostemin in facilitating breast cancer spheroid and tumor growth. **Breast Cancer Research**, vol. 17, no. 1, 2015. DOI 10.1186/s13058-015-0551-x.

TASOGLU, S.; DEMIRCI, U. Bioprinting for stem cell research. **Trends in Biotechnology**, vol. 31, no. 1, p. 10–19, 2013. DOI 10.1016/j.tibtech.2012.10.005.

TERASHIMA, J.; SAMPEI, S.; IIDZUKA, M.; OHSAKAMA, A.; TACHIKAWA, C.; SATOH, J.; KUDO, K.; HABANO, W.; OZAWA, S. VEGF expression is regulated by HIF-1α and ARNT in 3D KYSE-70, esophageal cancer cell spheroids. **Cell Biology International**, vol. 40, no. 11, p. 1187–1194, 2016. DOI 10.1002/cbin.10656.

THAKURI, P. S.; HAM, S. L.; LUKER, G. D.; TAVANA, H. Multiparametric Analysis of Oncology Drug Screening with Aqueous Two-Phase Tumor Spheroids. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 13, no. 11, p. 3724–3735, 2016. DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00527.

THEODORAKI, M. A.; REZENDE, C. O.; CHANTARASRIWONG, O.; CORBEN, A. D.; THEODORAKIS, E. A.; ALPAUGH, M. L. Spontaneously-forming spheroids as an *in vitro* cancer cell model for anticancer drug screening. **Oncotarget**, vol. 6, no. 25, 2015. DOI 10.18632/oncotarget.4013.

THOMA, C. R.; ZIMMERMANN, M.; AGARKOVA, I.; KELM, J. M.; KREK, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 69-70, p. 29–41, 2014. DOI 10.1016/j.addr.2014.03.001.

TIRINO, V.; DESIDERIO, V.; PAINO, F.; DE ROSA, A.; PAPACCIO, F.; LA NOCE, M.; LAINO, L.; DE FRANCESCO, F.; PAPACCIO, G. Cancer stem cells in solid tumors: An overview and new approaches for their isolation and characterization. **FASEB Journal**, vol. 27, no. 1, p. 13–24, 2013. DOI 10.1096/fj.12-218222.

TODARO, M.; ALEA, M. P.; DI STEFANO, A. B.; CAMMARERI, P.; VERMEULEN, L.; IOVINO, F.; TRIPODO, C.; RUSSO, A.; GULOTTA, G.; MEDEMA, J. P.; STASSI, G. Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. **Cell Stem Cell**, vol. 1, no. 4, p. 389–402, 2007. DOI 10.1016/j.stem.2007.08.001.

TRAN, M. N.; CHOI, W.; WSZOLEK, M. F.; NAVAI, N.; LEE, I. L. C.; NITTI, G.; WEN, S.; FLORES, E. R.; SIEFKER-RADTKE, A.; CZERNIAK, B.; DINNEY, C.; BARTON, M.; MCCONKEY, D. J. The p63 protein isoform ΔNp63α inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: Role of miR-205. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 288, no. 5, p. 3275–3288, 2013. DOI 10.1074/jbc.M112.408104.

TRAN, M. N.; JINESH G. G.; J. MCCONKEY, D.; M. KAMAT, A. Bladder Cancer Stem Cells. **Current Stem Cell Research & Therapy**, vol. 5, no. 4, p. 387–395, 2010. DOI 10.2174/157488810793351640.

TRÉDAN, O.; GALMARINI, C. M.; PATEL, K.; TANNOCK, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 99, no. 19, p. 1441–1454, 2007. DOI 10.1093/jnci/djm135.

TRUJILLO-DE SANTIAGO, G.; FLORES-GARZA, B. G.; TAVARES-NEGRETE, J. A.; LARA-MAYORGA, I. M.; GONZÁLEZ-GAMBOA, I.; ZHANG, Y. S.; ROJAS-MARTÍNEZ, A.; ORTIZ-LÓPEZ, R.; ÁLVAREZ, M. M. The tumor-on-chip: Recent advances in the development of microfluidic systems to recapitulate the physiology of solid tumors. **Materials**, vol. 12, no. 18, 2019. DOI 10.3390/ma12182945.

TSENG, H.; GAGE, J. A.; RAPHAEL, R. M.; MOORE, R. H.; KILLIAN, T. C.; GRANDE-ALLEN, K. J.; SOUZA, G. R. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, vol. 19, no. 9, p. 665–675, 2013. DOI 10.1089/ten.tec.2012.0157.

TURIN, I.; SCHIAVO, R.; MAESTRI, M.; LUINETTI, O.; BELLO, B.; PAULLI, M.; DIONIGI, P.; ROCCIO, M.; SPINILLO, A.; FERULLI, F.; TANZI, M.; MACCARIO, R.; MONTAGNA, D.; PEDRAZZOLI, P. In Vitro Efficient Expansion of Tumor Cells Deriving from Different Types of Human Tumor Samples. **Medical Sciences**, vol. 2, no. 2, p. 70–81, 2014. DOI 10.3390/medsci2020070.

TZANAKAKIS, E. S.; HANSEN, L. K.; HU, W. S. The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, vol. 48, no. 3, p. 175–189, 2001. DOI 10.1002/1097-0169(200103)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2.

URBANCZYK, M.; LAYLAND, S. L.; SCHENKE-LAYLAND, K. The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. **Matrix Biology**, vol. 85-86, no. xxxx, p. 1–14, 2020. DOI 10.1016/j.matbio.2019.11.005.

UZUNOGLU, S.; KARACA, B.; ATMACA, H.; KISIM, A.; SEZGIN, C.; KARABULUT, B.; USLU, R. Comparison of XTT and Alamar blue assays in the assessment of the viability of various human cancer cell lines by AT-101 (-/- gossypol). **Toxicology Mechanisms and Methods**, vol. 20, no. 8, p. 482–486, 2010. DOI 10.3109/15376516.2010.508080.

VALENCIA-GONZÁLEZ, H. A.; RUÍZ, G.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. Cancer stem cells from tumor cell lines activate the DNA damage response pathway after ionizing radiation more efficiently than noncancer stem cells. **Stem Cells International**, vol. 2019, 2019. DOI 10.1155/2019/7038953.

VALLE, J. W.; WASAN, H.; LOPES, A.; BACKEN, A. C.; PALMER, D. H.; MORRIS, K.; DUGGAN, M.; CUNNINGHAM, D.; ANTHONEY, D. A.; CORRIE, P.; MADHUSUDAN, S.; MARAVEYAS, A.; ROSS, P. J.; WATERS, J. S.; STEWARD, W. P.; REES, C.; BEARE, S.; DIVE, C.; BRIDGEWATER, J. A. Cediranib or placebo in combination with cisplatin and gemcitabine chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer (ABC-03): A randomised phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, vol. 16, no. 8, p. 967–978, 2015. DOI 10.1016/S1470-2045(15)00139-4.

VALLEY, M. P.; KUPCHO, K. R.; ZIMPRICH, C. A.; NILES, A. L.; CALI, J. J.; KELM, J. M.; MORITZ, W.; LAZAR, D. F. Abstract 3731: Luminescent cell health assays for tumor spheroid evaluation, p. 3731–3731, 2014. DOI 10.1158/1538-7445.am2014-3731.

VAN DER WORP, H. B.; HOWELLS, D. W.; SENA, E. S.; PORRITT, M. J.; REWELL, S.; O'COLLINS, V.; MACLEOD, M. R. Can animal models of disease reliably inform human studies? **PLoS Medicine**, vol. 7, no. 3, p. 1–8, 2010. DOI 10.1371/journal.pmed.1000245.

VAN DIJK, M.; GÖRANSSON, S. A.; STRÖMBLAD, S. Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer. **Experimental Cell Research**, vol. 319, no. 11, p. 1663–1670, 2013. DOI 10.1016/j.yexcr.2013.02.006.

VAN VLIET, E. Current standing and future prospects for the technologies proposed to transform toxicity testing in the 21st century. **ALTEX**, vol. 28, no. 1, p. 17–44, 2014. DOI 10.14573/altex.2011.1.017.

VASILIOU, V.; NEBERT, D. W. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. **Human Genomics**, vol. 2, no. 2, p. 138–143, 2005. DOI 10.1186/1479-7364-2-2-138.

VASYUTIN, I.; ZERIHUN, L.; IVAN, C.; ATALA, A. Bladder organoids and spheroids: Potential tools for normal and diseased tissue modelling. **Anticancer Research**, vol. 39, no. 3, p. 1105–1118, 2019. DOI 10.21873/anticanres.13219.

VERMA, I. M. Renato Dulbecco (1914-2012). **Nature**, vol. 483, no. 7390, p. 408, 2012. DOI 10.1038/483408a.

VINCI, M.; GOWAN, S.; BOXALL, F.; PATTERSON, L.; ZIMMERMANN, M.; COURT, W.; LOMAS, C.; MENDIOLA, M.; HARDISSON, D.; ECCLES, S. A. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, vol. 10, 2012. DOI 10.1186/1741-7007-10-29.

VIRGONE-CARLOTTA, A.; LEMASSON, M.; MERTANI, H. C.; DIAZ, J. J.; MONNIER, S.; DEHOUX, T.; DELANOË-AYARI, H.; RIVIÈRE, C.; RIEU, J. P. In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids: Effects of 5-Fluorouracil. **PLoS ONE**, vol. 12, no. 11, 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0188100.

VLACHOGIANNIS, G.; HEDAYAT, S.; VATSIOU, A.; JAMIN, Y.; FERNÁNDEZ-MATEOS, J.; KHAN, K.; LAMPIS, A.; EASON, K.; HUNTINGFORD, I.; BURKE, R.; RATA, M.; KOH, D. M.; TUNARIU, N.; COLLINS, D.; HULKKI-WILSON, S.; RAGULAN, C.; SPITERI, I.; MOORCRAFT, S. Y.; CHAU, I.; … VALERI, N. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. **Science**, vol. 359, no. 6378, p. 920–926, 2018. DOI 10.1126/science.aao2774.

VOEST, E. E.; BERNARDS, R. DNA-guided precision medicine for cancer: A case of irrational exuberance? **Cancer Discovery**, vol. 6, no. 2, p. 130–132, 2016. DOI 10.1158/2159-8290.CD-15-1321.

VOISSIERE, A.; JOUBERTON, E.; MAUBERT, E.; DEGOUL, F.; PEYRODE, C.; CHEZAL, J. M.; MIOT-NOIRAULT, E. Development and characterization of a human three-dimensional chondrosarcoma culture for in vitro drug testing. **PLoS ONE**, vol. 12, no. 7, 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0181340.

WAGNER, I.; MATERNE, E. M.; BRINCKER, S.; SÜSSBIE, U.; FRÄDRICH, C.; BUSEK, M.; SONNTAG, F.; SAKHAROV, D. A.; TRUSHKIN, E. V.; TONEVITSKY, A. G.; LAUSTER, R.; MARX, U. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. **Lab on a Chip**, vol. 13, no. 18, p. 3538–3547, 2013. DOI 10.1039/c3lc50234a.

WALLACE, D. G.; ROSENBLATT, J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 55, no. 12, p. 1631–1649, 2003. DOI 10.1016/j.addr.2003.08.004.

WAN, X.; LI, Z.; YE, H.; CUI, Z. Three-dimensional perfused tumour spheroid model for anti-cancer drug screening. **Biotechnology Letters**, vol. 38, no. 8, p. 1389–1395, 2016. DOI 10.1007/s10529-016-2035-1.

WANG, C.; TANG, Z.; ZHAO, Y.; YAO, R.; LI, L.; SUN, W. Three-dimensional in vitro cancer models: A short review. **Biofabrication**, vol. 6, no. 2, 2014. DOI 10.1088/1758-5082/6/2/022001.

WANG, J. Z.; ZHU, Y. X.; MA, H. C.; CHEN, S. N.; CHAO, J. Y.; RUAN, W. D.; WANG, D.; DU, F. G.; MENG, Y. Z. Developing multi-cellular tumor spheroid model (MCTS) in the chitosan/collagen/alginate (CCA) fibrous scaffold for anticancer drug screening. **Materials Science and Engineering C**, vol. 62, p. 215–225, 2016. DOI 10.1016/j.msec.2016.01.045.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resistance**, 2019. DOI 10.20517/cdr.2019.10.

WANG, Y.; LIU, Y.; MALEK, S. N.; ZHENG, P.; LIU, Y. Targeting HIF1α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. **Cell Stem Cell**, vol. 8, no. 4, p. 399–411, 2011. DOI 10.1016/j.stem.2011.02.006.

WARD, J. P.; KING, J. R. Mathematical modelling of avascular-tumour growth. **IMA Journal of Mathemathics Applied in Medicine and Biology**, vol. 14, no. 1, p. 39–69, 1997. DOI 10.1093/imammb14.1.39.

WARING, M. J.; ARROWSMITH, J.; LEACH, A. R.; LEESON, P. D.; MANDRELL, S.; OWEN, R. M.; PAIRAUDEAU, G.; PENNIE, W. D.; PICKETT, S. D.; WANG, J.; WALLACE, O.; WEIR, A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 14, no. 7, p. 475–486, 2015. DOI 10.1038/nrd4609.

WARTENBERG, M.; LING, F. C.; MÜSCHEN, M.; KLEIN, F.; ACKER, H.; GASSMANN, M.; PETRAT, K.; PÜTZ, V.; HESCHELER, J.; SAUER, H. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, vol. 17, no. 3, p. 503–505, 2003. DOI 10.1096/fj.02-0358fje.

WEEBER, F.; OOFT, S. N.; DIJKSTRA, K. K.; VOEST, E. E. Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. **Cell Chemical Biology**, vol. 24, no. 9, p. 1092–1100, 2017. DOI 10.1016/j.chembiol.2017.06.012.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, vol. 17, no. 1, p. 1–15, 2015. DOI 10.1016/j.neo.2014.12.004.

WEISWALD, L. B.; GUINEBRETIÈRE, J. M.; RICHON, S.; BELLET, D.; SAUBAMÉA, B.; DANGLES-MARIE, V. In situ protein expression in tumour spheres: Development of an immunostaining protocol for confocal microscopy. **BMC Cancer**, vol. 10, 2010. DOI 10.1186/1471-2407-10-106.

WEN, Z.; LIAO, Q.; HU, Y.; YOU, L.; ZHOU, L.; ZHAO, Y. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 46, no. 7, p. 634–642, 2013. DOI 10.1590/1414-431X20132647.

WENZEL, C.; RIEFKE, B.; GRÜNDEMANN, S.; KREBS, A.; CHRISTIAN, S.; PRINZ, F.; OSTERLAND, M.; GOLFIER, S.; RÄSE, S.; ANSARI, N.; ESNER, M.; BICKLE, M.; PAMPALONI, F.; MATTHEYER, C.; STELZER, E. H.; PARCZYK, K.; PRECHTL, S.; STEIGEMANN, P. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. **Experimental Cell Research**, vol. 323, no. 1, p. 131–143, 2014. DOI 10.1016/j.yexcr.2014.01.017.

WERNER, E.; WERB, Z. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. **Journal of Cell Biology**, vol. 158, no. 2, p. 357–368, 2002. DOI 10.1083/jcb.200111028.

WIESNER, F. G.; MAGENER, A.; FASCHING, P. A.; WESSE, J.; BANI, M. R.; RAUH, C.; JUD, S.; SCHRAUDER, M.; LOEHBERG, C. R.; BECKMANN, M. W.; HARTMANN, A.; LUX, M. P. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. **Breast**, vol. 18, no. 2, p. 135–141, 2009. DOI 10.1016/j.breast.2009.02.009.

WIGERUP, C.; PÅHLMAN, S.; BEXELL, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, vol. 164, p. 152–169, 2016. DOI 10.1016/j.pharmthera.2016.04.009.

WILLEY, C. D.; GILBERT, A. N.; ANDERSON, J. C.; GILLESPIE, G. Y. Patient-Derived Xenografts as a Model System for Radiation Research. **Seminars in Radiation Oncology**, vol. 25, no. 4, p. 273–280, 2015. DOI 10.1016/j.semradonc.2015.05.008.

WILLYARD, C. The Mice That Grow Human Tumours. **Nature**, vol. 560, p. 156–157, 2018. DOI 10.1016/j.outlook.2009.10.005.

WOJTKOWIAK, J. W.; VERDUZCO, D.; SCHRAMM, K. J.; GILLIES, R. J. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 8, no. 6, p. 2032–2038, 2011. DOI 10.1021/mp200292c.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, vol. 30, no. 1, 2011. DOI 10.1186/1756-9966-30-87.

WORTHINGTON, P.; DRAKE, K. M.; LI, Z.; NAPPER, A. D.; POCHAN, D. J.; LANGHANS, S. A. Beta-hairpin hydrogels as scaffolds for high-throughput drug discovery in three-dimensional cell culture. **Analytical Biochemistry**, vol. 535, p. 25–34, 2017. DOI 10.1016/j.ab.2017.07.024.

WORTHINGTON, P.; POCHAN, D. J.; LANGHANS, S. A. Peptide hydrogels - versatile matrices for 3D cell culture in cancer medicine. **Frontiers in Oncology**, vol. 5, no. APR, 2015. DOI 10.3389/fonc.2015.00092.

WU, M.; MELODY, A. S. Modeling tumor microenvironments in Vitro. **Journal of Biomechanical Engineering**, vol. 136, no. 2, 2014. DOI 10.1115/1.4026447.

WU, S.; LIU, X.; YEUNG, K. W. K.; LIU, C.; YANG, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering R: Reports**, vol. 80, no. 1, p. 1–36, 2014. DOI 10.1016/j.mser.2014.04.001.

WU, X.; FAN, W.; XU, S.; ZHOU, Y. Sensitization to the Cytotoxicity of Cisplatin by Transfection with Nucleotide Excision Repair Gene Xeroderma Pigmentosun Group A Antisense RNA in Human Lung Adenocarcinoma Cells. **Clinical Cancer Research**, vol. 9, no. 16 I, p. 5874–5879, 2003. .

WÜRBEL, H. More than 3Rs: The importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. **Lab Animal**, vol. 46, no. 4, p. 164–166, 2017. DOI 10.1038/laban.1220.

XIE, B. Y.; WU, A. W. Organoid culture of isolated cells from patient-derived tissues with colorectal cancer. **Chinese Medical Journal**, vol. 129, no. 20, p. 2469–2475, 2016. DOI 10.4103/0366-6999.191782.

XIONG, G. F.; XU, R. Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, vol. 2, no. 9, p. 357, 2016. DOI 10.20517/2394-4722.2016.08.

XU, F.; CELLI, J.; RIZVI, I.; MOON, S.; HASAN, T.; DEMIRCI, U. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. **Biotechnology Journal**, vol. 6, no. 2, p. 204–212, 2011. DOI 10.1002/biot.201000340.

XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. **Biotechnology Advances**, vol. 32, no. 7, p. 1256–1268, 2014. DOI 10.1016/j.biotechadv.2014.07.009.

YANG, L. Y.; LI, L.; JIANG, H.; SHEN, Y.; PLUNKETT, W. Expression of ERCC1 antisense RNA abrogates gemcitabine-mediated cytotoxic synergism with cisplatin in human colon tumor cells defective in mismatch repair but proficient in nucleotide excision repair. **Clinical Cancer Research**, vol. 6, no. 3, p. 773–781, 2000

YAO, R.; ZHANG, R.; LIN, F.; LUAN, J. Biomimetic injectable HUVEC-adipocytes/collagen/alginate microsphere co-cultures for adipose tissue engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 110, no. 5, p. 1430–1443, 2013. DOI 10.1002/bit.24784.

YEON, S. E.; NO, D. Y.; LEE, S. H.; NAM, S. W.; OH, I. H.; LEE, J.; KUH, H. J. Application of Concave Microwells to Pancreatic Tumor Spheroids Enabling Anticancer Drug Evaluation in a Clinically Relevant Drug Resistance Model. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 9, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0073345.

YO, M.; MAHTABFAR, A.; BEELEN, P.; DEMIRYUREK, Y.; SHREIBER, D.; ZAHN, J.; FOTY, R.; LIU, L.; LIN, H. Coherent timescales and mechanical structure of multicellular agregates. **Biophysical Journal**, vol. 114, p. 2703–2716, 2018. DOI 10.1016/j.b.p.j.2018.04.025.

YOSHIDA, G. J. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. **Journal of Hematology and Oncology**, vol. 13, no. 1, p. 1–16, 2020. DOI 10.1186/s13045-019-0829-z.

YULYANA, Y.; HO, I. A. W.; SIA, K. C.; NEWMAN, J. P.; TOH, X. Y.; ENDAYA, B. B.; CHAN, J. K. Y.; GNECCHI, M.; HUYNH, H.; CHUNG, A. Y. F.; LIM, K. H.; LEONG, H. S.; IYER, N. G.; HUI, K. M.; LAM, P. Y. P. Paracrine factors of human fetal MSCs inhibit liver cancer growth through reduced activation of IGF-1R/PI3K/Akt signaling. **Molecular Therapy**, vol. 23, no. 4, p. 746–756, 2015. DOI 10.1038/mt.2015.13.

ZAHIR, N.; WEAVER, V. M. Death in the third dimension: Apoptosis regulation and tissue architecture. **Current Opinion in Genetics and Development**, vol. 14, no. 1, p. 71–80, 2004. DOI 10.1016/j.gde.2003.12.005.

ZAHREDDINE, H.; BORDEN, K. L. B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 4 MAR, 2013. DOI 10.3389/fphar.2013.00028.

ZANONI, M.; PICCININI, F.; ARIENTI, C.; ZAMAGNI, A.; SANTI, S.; POLICO, R.; BEVILACQUA, A.; TESEI, A. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, vol. 6, 2016. DOI 10.1038/srep19103.

ZEEGERS, M. P. A.; TAN, F. E. S.; DORANT, E.; VAN DEN BRANDT, P. A. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. **Cancer**, vol. 89, no. 3, p. 630–639, 2000. DOI 10.1002/1097-0142(20000801)89:3<630::AID-CNCR19>3.0.CO;2-Q.

ZENG, S. X.; ZHU, Y.; MA, A. H.; YU, W.; ZHANG, H.; LIN, T. Y.; SHI, W.; TEPPER, C. G.; HENDERSON, P. T.; AIRHART, S.; GUO, J. M.; XU, C. L.; DEVERE WHITE, R. W.; PAN, C. X. The phosphatidylinositol 3-kinase pathway as a potential therapeutic target in bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, vol. 23, no. 21, p. 6580–6591, 2017. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-17-0033.

ZHANG, J.; WANG, Z.; HU, X.; WANG, B.; WANG, L.; YANG, W.; LIU, Y.; LIU, G.; DI, G.; HU, Z.; WU, J.; SHAO, Z. Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer. **International Journal of Cancer**, vol. 136, no. 1, p. 204–211, 2015. DOI 10.1002/ijc.28966.

ZHANG, S.; GELAIN, F.; ZHAO, X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 15, no. 5 SPEC. ISS., p. 413–420, 2005. DOI 10.1016/j.semcancer.2005.05.007.

ZHANG, S.; ZHAO, X.; SPIRIO, L. PuraMatrix: Self-assembling peptide nanofiber scaffolds. **Scaffolding in Tissue Engineering**, p. 217–238, 2005. DOI 10.1081/e-ebpp-120052200.

ZHANG, W.; LEE, W. Y.; SIEGEL, D. S.; TOLIAS, P.; ZILBERBERG, J. Patient-specific 3D microfluidic tissue model for multiple myeloma. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, vol. 20, no. 8, p. 663–670, 2014. DOI 10.1089/ten.tec.2013.0490.

ZHANG, Y. S.; KHADEMHOSSEINI, A. Advances in engineering hydrogels. **Science**, vol. 356, no. 6337, 2017. DOI 10.1126/science.aaf3627.

ZHANG, Z.; NAGRATH, S. Microfluidics and cancer: Are we there yet? **Biomedical Microdevices**, vol. 15, no. 4, p. 595–609, 2013. DOI 10.1007/s10544-012-9734-8.

ZHANG, Z.; TANG, W. Drug metabolism in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, vol. 8, no. 5, p. 721–732, 2018. DOI 10.1016/j.apsb.2018.04.003.

ZHANG, Z.; WANG, H.; DING, Q.; XING, Y.; XU, Z.; LU, C.; LUO, D.; XU, L.; XIA, W.; ZHOU, C.; SHI, M. Establishment of patient-derived tumor spheroids for non-small cell lung cancer. **PLoS ONE**, vol. 13, no. 3, 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0194016.

ZHOU, H.; FAN, Z.; DENG, J.; LEMONS, P. K.; ARHONTOULIS, D. C.; BOWNE, W. B.; CHENG, H. Hyaluronidase Embedded in Nanocarrier PEG Shell for Enhanced Tumor Penetration and Highly Efficient Antitumor Efficacy. **Nano Letters**, vol. 16, no. 5, p. 3268–3277, 2016. DOI 10.1021/acs.nanolett.6b00820.

ZIMMERMANN, M.; BOX, C.; ECCLES, S. A. Two-dimensional vs. Three-dimensional in vitro tumor migration and invasion assays. **Methods in Molecular Biology**, vol. 986, p. 227–252, 2013. DOI 10.1007/978-1-62703-311-4_15.

ZIÓŁKOWSKA, K.; STELMACHOWSKA, A.; KWAPISZEWSKI, R.; CHUDY, M.; DYBKO, A.; BRZÓZKA, Z. Long-term three-dimensional cell culture and anticancer drug activity evaluation in a microfluidic chip. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 40, no. 1, p. 68–74, 2013. DOI 10.1016/j.bios.2012.06.017.

9. Anexos

Anexo 1. Termo de direitos autorais do periódico *Frontiers in Physiology*

Frontiers Copyright Statement

All content included on Frontiers websites (including Loop), such as text, graphics, logos, button icons, images, video/audio clips, downloads, data compilations and software, is the property of Frontiers if created by Frontiers, or of the person or entity who or which owned it prior to submission to Frontiers. If not owned by Frontiers, it is licensed to Frontiers Media SA (Frontiers) or its licensees and/or subcontractors.

The copyright in the text of individual articles (including research articles, opinion articles, book reviews, conference proceedings and abstracts) is not the property of Frontiers, and its ownership is not affected by its submission to or publication by Frontiers. Frontiers benefits from a general licence over all content submitted to it, and both Frontiers and its users benefit from a Creative Commons CC-BY licence over all content, as specified below.

Images and graphics not forming part of user-contributed materials are the property of or are licensed to Frontiers may not be downloaded or copied without Frontiers' explicit and specific permission or in accordance with any specific copyright notice attached to that material.

The combination of all content on Frontiers websites, as well as the design and the look and feel of the Frontiers websites, and the copyright and all other rights in such content and combination, are the sole property of Frontiers.

As an author or contributor you grant permission to others to reproduce your articles, **including any graphics and third-party materials supplied by you**, in accordance with the Frontiers Terms and Conditions. The licence granted to third parties over all contents of each article, **including third-party elements**, is a Creative Commons Attribution ("CC BY") licence. The current version is CC-BY, version 4.0, and the licence will automatically be updated as and when updated by the Creative Commons organisation.

You may include a requirement to reproduce copyright notices in materials contributed by you, but you may not restrict the right to reproduce the entire article, including third-party graphics. This means that you must obtain any necessary third-party consents and permissions to reproduce third-party materials in your articles submitted to Frontiers.

E-books are subject to the same licensing conditions as the articles within them.

Articles published prior to the effective date of this notice: Please note that reproduction of third-party graphics and other third-party materials contained in articles published prior to the effective date of this notice may be subject to third-party notices prohibiting their reproduction without permission. You must comply with those notices.

Articles published prior to July 2012: The licence granted for these articles may be different and you should check the pdf version of any article to establish what licence was granted. If an article, dating from before July 2012, carries only a non-commercial licence and you wish to obtain a commercial licence, please contact Frontiers at editorial.office@frontiersin.org.

All software used on this website, and the copyright in the code constituting such software, is the property of or is licensed to Frontiers and its use is restricted in accordance with the Frontiers Terms and Conditions. All copyright, and all rights therein, are protected by national and international copyright laws.

This Copyright Statement comes into effect on **25th May, 2018**.

Anexo 2. E-mail de confirmação de direitos autorais enviado pelo escritório editorial do periódico *Frontiers in Physiology*

From: **Frontiers Editorial Office** editorial.office@frontiersin.org
Subject: Re: Image usage term
Date: May 21, 2020 at 4:16
To: Robson Amaral amaral.r@usp.br

Dear Robson,

Thank you for your email.

Under the Frontiers Terms and Conditions, authors retain the copyright to their work. Furthermore, all Frontiers articles are Open Access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 3,0), which permits the use, distribution and reproduction of material from published articles, provided the original authors and source are credited, and subject to any copyright notices concerning any third-party content. More information about CC-BY can be found here: http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

You can therefore freely reuse your article, or parts of it, in your thesis.

Best regards,

Gearóid

Senior Manager, Research Integrity: Gearóid Ó Faoleán, PhD

Frontiers | London Office
12 Moorgate
EC2R 6DA
London, UK
Office T +44 203 514 26 98

Now more than ever, open and rapid access to the latest scientific results are paramount in these unprecedented times of the COVID-19 pandemic. As we all work with our communities to mitigate its impact, we are continuing Frontiers publishing services and our support to researchers in disseminating their work. Please visit our Coronavirus Knowledge Hub to find out about the initiatives from scientists around the world.

Anexo 3. Termo de direitos autorais do periódico *Cancers.*

Copyrights

Copyright and Licensing

For all articles published in MDPI journals, copyright is retained by the authors. Articles are licensed under an open access Creative Commons CC BY 4.0 license, meaning that anyone may download and read the paper for free. In addition, the article may be reused and quoted provided that the original published version is cited. These conditions allow for maximum use and exposure of the work, while ensuring that the authors receive proper credit.

In exceptional circumstances articles may be licensed differently. If you have specific condition (such as one linked to funding) that does not allow this license, please mention this to the editorial office of the journal at submission. Exceptions will be granted at the discretion of the publisher.

Anexo 4. E-mail de confirmação de direitos autorais enviado pelo escritório editorial do periódico *Cancers.*

From: **Support** support@mdpi.com
Subject: Re: Image usage term
Date: May 22, 2020 at 5:28
To: Robson Amaral amaral.r@usp.br

Dear Robson,

Thank you for your email.

Your paper is an an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, *provided the original work is properly cited*. You do not need to get the journals authorization.

If you any other questions, feel free to tell me.

Kind regards,

Helena Pei
MDPI Support

On 2020/5/20 23:47, Robson Amaral wrote:

> Dear,
> My manuscript has just been accepted for publication (cancers-794330) at Cancers. The research was part of my PhD project. Regarding the
>
> **See More**
>
> Dear,
> My manuscript has just been accepted for publication (cancers-794330) at Cancers. The research was part of my PhD project. Regarding the
>
> <tel:%2B55%2016%203315%200250>/ /Email: amaral.r@usp.br <mailto:amaral.r@usp.br>/