UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LARISSA BUENO TOFANI

Estabelecimento de sistemas de cultivo tridimensionais (3D) utilizando células de câncer de ovário como plataforma para ensaios de toxicidade

> Ribeirão Preto 2019

LARISSA BUENO TOFANI

Estabelecimento de sistemas de cultivo tridimensionais (3D) utilizando células de câncer de ovário como plataforma para ensaios de toxicidade

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 10/01/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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.

Tofani, Larissa Bueno

Estabelecimento de sistemas de cultivos tridimensionais (3D) utilizando células de câncer de ovário como plataforma para ensaio de toxicidade. Ribeirão Preto, 2019. 136 p.; 30 cm.

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

Orientador: Antonietto, Kamilla Swiech.

Sistemas de cultivo 3D 2. Esferoides 3. Alginato (Scaffold)
 4. Câncer de Ovário 5. Toxicidade de fármacos

RESUMO

TOFANI, L. B. Estabelecimento de sistemas de cultivo tridimensionais (3D) utilizando células de câncer de ovário como plataforma para ensaios de toxicidade. 2019. 136f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Para que um novo medicamento cheque ao mercado, estima-se que seiam necessários 10 anos de desenvolvimento com um custo aproximado de 2,6 bilhões de dólare. Além disso, a determinação da toxicidade desse medicamento durante seu desenvolvimento corresponde a um dos principais desafios, uma vez 98% dos novos candidatos a fármacos falham em segurança e eficácia. Embora modelos in vivo tenham sido amplamente utilizados para avaliar a toxicidade de diferentes susbtâncias, diversas limitações estão associadas à sua utilização como alto custo, elevado número de animais, variabilidade de procedimentos empregados e aspectos éticos. Em função disso, ensaios in vitro baseados em cultura de células vêm sendo utilizados por apresentar um melhor custobenefício, maior reprodutibilidade e possibilidade de aplicação em plataformas de triagem automatizada em larga escala (HTS). No entanto, uma vez que o cultivo celular em monocamada (2D) tradicional pode não predizer de maneira adequada o que ocorre no ambiente in vivo, a utilização do cultivo celular tridimensional (3D) está ganhando cada vez mais importância, por reproduzir diversas características do ambiente nativo, tais como: heterogeneidade celular, interação célula-célula e célula-matriz extracelular, perfil de expressão gênica, cinética de crescimento, perfil de resistência à fármacos, dentre outros. O câncer de ovário é o sétimo tumor mais comum, sendo que o principal desafio durante seu tratamento é a frequente quimioresistência adquirida pelas pacientes. Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes técnicas de cultivos 3D utilizando células de adenocarcinoma de ovário (SKOV-3 e OVCAR-3) com o intuito de estabelecer um modelo in vitro para ensaios de toxicidade com maior capacidade preditiva. Para isso, o cultivo celular 3D foi realizado na forma de esferoides utilizando as técnicas de flutuação forcada (FF) e hanging-drop (HD) em mono (SKOV-3 e OVCAR-3) e co-cultura (SKOV-3:células mesenguimais-MCU-9 e SKOV-3:fibroblastos-CCD27-Sk) e em sistemas híbridos (esferoides obtidos em biorreatores do tipo spinner encapsulados em matriz de alginato) em mono (SKOV-3) e co-cultura (SKOV-3:fibroblastos-HDFs). Os esferoides obtidos nos diferentes sistemas foram avaliados em função de sua morfologia (diâmetro, circularidade e estrutura organizacional), crescimento e viabilidade celular, perfil de expressão gênica e resposta após exposição ao fármaco Paclitaxel. Inicialmente, esferoides obtidos com as células SKOV-3 e OVCAR-3 apresentaram-se pouco compactos e, em função disso, foi necessária a aplicação de um estímulo externo à técnica FF (centrifugação da placa ULA) e adição da metilcelulose (MC) ao meio de cultura (0,25% e 0,5%, p/v). Após adição da MC (FF e HD), esferoides mais esféricos com diâmetros em torno de 200-500 µm, com maior número de microvilosidades), menor taxa de crescimento e maior conteúdo apoptótico foram obtidos, quando comparado ao cultivo 2D. Co-culturas (SKOV-3:MCU-9 e SKOV-3:CCD27-Sk) obtidas utilizando a técnica FF também formaram esferoides regulares com diâmetros em torno de 200-500 µm, com maior presença de microvilosidades. A associação das células SKOV-3 com células mesenquimais em 3D propiciou uma melhor recapitulação do ambiente tumoral in vivo devido ao perfil de expressão dos genes avaliados (MMP-2, MMP-9, HIF1-α, VEGF, SNAIL, ZEB1, vimentina e β-catenina). Todos os sistemas 3D (FF e HD) apresentaram maior resistência após exposição ao fármaco Paclitaxel, quando comparado ao cultivo em 2D. Já o sistema híbrido obtido após formação dos esferoides em biorreatores do tipo spinner (SKOV-3) propiciou um maior número esferoides ao final de 21 dias de cultivo, guando comparado às técnicas FF e HD, com manutenção da viabilidade celular durante todo o cultivo. Não foi observada a fusão dos esferoides ao longo da cultura após encapsulação em alginato. Assim como para os sistemas estáticos (FF e HD), as cápsulas em mono-SKOV-3 (IC₅₀= 11,48 µg/mL) e co-cultura- SKOV-3:HDFs (IC₅₀ = 17,63 µg/mL) demonstraram maior resistência ao Paclitaxel, quando comparadas ao cultivo 2D ($IC_{50} = 5,13 \mu g/mL$). Os resultados apresentados ao longo deste trabalho sugerem que a co-cultura SKOV-3:MCU-9 apresenta melhores características para ensaios drug screenig em um curto período, em função da facilidade de obtenção, recapitulação da resposta celular in vivo e custo-benefício. Já a co-cultura em sistema híbrido SKOV-3:HDFs pode ser utilizada para ensaios a longo termo, em função da viabilidade e resposta da cultura. Além disso, os resultados obtidos podem contribuir para a consolidação e padronização dos sistemas de cultivo celular 3D para o screening de novos fármacos para o tratamento do câncer.

Palavras-chaves: câncer de ovário, cultivo celular 3D, esferoides, flutuação forçada, *hanging-drop*, co-culturas, encapsulação em alginato.

ABSTRACT

TOFANI, L.B. Establishment of the tridimensional (3D) culture using ovarian cancer cells as platform to cytotoxicity assays. 2019. 136f. PhD. Thesis. School of Pharmaceutical Science of Ribeirao Preto - University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2019.

For a new drug reaching the market 10 years of development are estimated, with a cost of approximately US\$2.6 billion. One of the main challenges in developing a new drug is the determination of its toxicity, once that 98% of new drugs fail in safety and efficacy assays. Although in vivo models have been widely used to evaluate the toxicity of the different compounds, several limitations can be associated with their use such as need of high number of animals, variability and ethical aspects. As a result, in vitro assays based on cell culture are being used once they present better cost, higher reproducibility and possibility of application in high throughput screening platforms (HTS). However, as cell culture in monolayer (2D) can't predict adequately what occurs in the in vivo environment, the use of three-dimensional (3D) cell culture achieve importance due to the reproduction of the several characteristics of the native environment, such as: cell heterogeneity, cellcell and cell-extracellular matrix interaction, gene expression profile, growth kinetics, drug resistance profile, among others. Ovarian cancer is the seventh most common tumor and the main challenge during its treatment is the frequent chemoresistance acquired by the by patients. This study aimed to evaluate different 3D cell culture techniques using ovarian adenocarcinoma cells (SKOV-3 and OVCAR-3) in order to establish an in vitro model for toxicity assays with higher predictive capacity. For this, 3D cell culture was performed in the form of spheroids, using forced floating (FF) and hangingdrop (HD) techniques in mono (SKOV-3 and OVCAR-3) and co-cultures (SKOV-3: mesenchymal cells-MCU-9and SKOV-3:fibroblasts-CCD27-Sk) and hybrid systems (spheroids obtained in spinner-type bioreactor encapsulated in alginate matrix) in mono (SKOV-3) and co-culture (SKOV-3:fibroblast-HDFs). The spheroids obtained in the different systems were evaluated according to their morphology (diameter, circularity and structure organization), cell growth and viability, gene expression profile and response after exposure to the drug Paclitaxel. Initially, spheroids obtained with SKOV-3 and OVCAR-3 cells presented low compaction and, as a result, it was necessary applying an external stimulus to the FF technique (centrifugation of the ULA plate) and the addition of methylcellulose (MC) to culture medium (0.25% and 0.5%, w/v). After addition of MC (FF and HD), more spherical spheroids with diameters around 200-500 µm, with the presence of a higher number of microvilli, lower growth profile and higher apoptotic content were obtained, when compared to 2D culture. Co-cultures (SKOV-3:MCU-9 and SKOV-3:CCD27-Sk) obtained using the FF technique also formed regular spheroids with diameters of 200-500 µm, with higher presence of microvilli. The association of SKOV-3 cells with mesenchymal cells in 3D provided a better recapitulation of the in vivo tumor environment due to the expression profile of the genes evaluated (MMP-2, MMP-9, HIF1- α , VEGF, SNAIL, ZEB1, vimentin and β -catenin). All of the spheroids obtained in 3D systems evaluated (FF and HD) showed higher resistance after exposure to the Paclitaxel drug, when compared to 2D culture. The hybrid system obtained after spheroid formation in spinner bioreactor (SKOV-3) provided a higher number of spheroids at the end of 21 days of the culture, when compared to the FF and HD techniques, maintaining the cell viability. Spheroid fusion was not observed throughout the culture after encapsulation in alginate. As for static systems (FF and HD), capsules in mono-SKOV-3 (IC₅₀ = 11.48 μ g/mL) and co-culture-SKOV-3:HDFs (IC₅₀ = 17.63 μ g/mL) demonstrated higher resistance to Paclitaxel, when compared to 2D culture ($IC_{50} = 5.13 \mu g/mL$). The results presented suggest that the co-culture SKOV-3:MCU-9 is adequate for short-term drug screening assays, due to its ease of spheroids obtaining, recapitulation of the in vivo cellular response and cost-effectiveness. Co-culture in SKOV-3:HDFs in hybrid system could be used for long term assays, due to their viability and response of the culture. In addition, the results may contribute to the consolidation and standardization of 3D cell culture systems for drug screening of new drugs for cancer treatment.

Key words: Ovarian cancer, 3D cell culture, spheroids, forced floating, *hanging-drop*, co-cultures, alginate encapsulation.

1. Introdução

2

1.1. Estudos de toxicidade de fármacos em modelos tradicionais *in vivo* e *in vitro*

O desenvolvimento de um novo medicamento compreende quatro etapas principais: (i) descoberta, (ii) estudos pré-clínicos, (iii) estudos clínicos e (iv) aprovação regulatória (PARIDAH et al., 2016). Estima-se que seja necessário em média 10 anos para que um novo medicamento chegue ao mercado, com um custo superior a 2,6 bilhões de dólares (ZHANG; TANG, 2018). Além disso, um dos principais desafios durante seu desenvolvimento é a determinação de sua toxicidade, que deve ocorrer idealmente logo no início dos ensaios pré-clinicos, uma vez que os efeitos adversos correspondem à segunda causa da retirada destes do mercado (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012). Estima-se que a taxa de candidatos a novos fármacos que falham em segurança e eficácia corresponda a 98% (ZHAI et al., 2019), sendo que a maioria das irregularidades são observadas nos estudos de fase clínica III e IV (PARIDAH et al., 2016). Por isso, a previsão rigorosa da toxicidade destes compostos é de suma importância para otimização e redução dos custos com o desenvolvimento de novos medicamentos (PARK et al., 2013).

Embora os modelos *in vivo* tenham sido originalmente desenvolvidos para avaliar o potencial tóxico de determinadas substâncias, o uso de animais tem sido muito questionado atualmente. Limitações como disponibilidade de animais, variabilidade dos procedimentos empregados, aspectos éticos, custo de manutenção (ELLIOTT; YUAN, 2011), além da difícil predição da resposta em humanos e diferenças entre a fisiologia de ambos, tais como dieta, idade e estado de saúde, têm sido associada à utilização de animais experimentais (BENAM et al., 2019). Diversos modelos *in vivo* são utilizados na experimentação pré-clínica, como o modelo xenográfico que baseia-se na injeção subcutânea de células tumorais humanas em animais imunossuprimidos, permitindo assim o crescimento do tumor e avaliação da resposta frente ao fármaco testado (ASGHAR et al., 2015). No entanto, além das limitações já citadas, sua utilização está associada à necessidade de um hospedeiro imunossuprimido, de amostras frescas de pacientes e um maior tempo para obtenção dos resultados (HOLEN et al., 2017).

Para que uma experimentação animal possa ser conduzida é essencial que esta apresente alta qualidade e máxima relevância, estando de acordo com o

Princípio dos 3'Rs, estabelecido por Russel e Burch (1959), que preconiza: (1) *Redução*: uso de alternativas para reduzir o número de animais para obtenção de uma informação precisa; (2) *Refinamento*: uso de procedimentos que diminuem a severidade das técnicas aplicadas aos animais e (3) Substituição: uso de metodologias alternativas (MADDEN et al., 2012). Abordagens que contribuem para o princípio dos 3'Rs incluem o uso de tecnologias não–invasivas como a utilização de análise de imagens, substituição de primatas não-humanos por modelos de camundongos geneticamente modificados, metodologias *in vitro* avançadas, dentre outras (PRESCOTT; LANGERMANS; RAGAN, 2017).

Os modelos *in vitro baseados* em cultura de células vêm sendo utilizados para o *screening* de novos fármacos, uma vez que permitem a economia de tempo e custo de processo, maior número de repetições, miniaturização e automatização, bem como a minimização dos requisitos éticos relacionados aos modelos *in vivo* (CAMPOS et al., 2018). Desde o estabelecimento do cultivo celular *in vitro* no final do século 20, um grande número de pesquisas envolvendo ensaios farmacológicos e toxicológicos vem sendo reportados nesses modelos (BEISSNER et al., 2018). As células respondem aos efeitos de determinadas substâncias devido às alterações intrínsecas em seu crescimento e metabolismo, bem como alterações na transcrição de genes que controlam suas funções básicas (EISENBRAND et al., 2002).

As culturas celulares *in vitro* são obtidas utilizando-se diferentes tipos de células (AMELIAN et al., 2017). As culturas celulares primárias são derivadas de tecidos ou órgãos que são desagregados por meio de técnicas químicas, mecânicas ou enzimáticas (HEMATIAN et al., 2016). Algumas limitações estão associadas à sua utilização como alta variabilidade entre as culturas, reduzida capacidade proliferativa e maior tempo de cultivo (MARTINOVICH et al., 2017). Já as linhagens celulares são células imortalizadas que apresentam diversas vantagens em relação à cultura celular primária como cultivo de maneira indefinida, obtenção de um grande número celular, minimização da variabilidade entre as culturas, menor custo e melhor controle durante o cultivo (GORDON; AMINI; WHITE, 2013)(ČUPERLOVIĆ-CULF et al., 2010). Mais de 4000 linhagens celulares provenientes de mais de 150 espécies já foram estabelecidas para o *screening* novas moléculas (YIN et al., 2019). Dependendo da capacidade de adesão celular, tanto as culturas primárias quanto às linhagens celulares podem ser classificadas entre aderentes, que apresentam a capacidade de se aderir a uma determinada superfície ou em

3

suspensão, cujo cultivo se faz sob agitação magnética para promover a circulação do meio de cultura e crescimento celular (AMELIAN et al., 2017).

Tradicionalmente, as células são cultivadas em ambiente estático em monocamada (2D) em garrafas de cultura ou placas de Petri, sendo subcultivadas após atingirem confluência para evitar o estado de senescência celular ou exaustão de nutrientes do meio de cultura (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Os sistemas de cultivo celular 2D foram primeiramente introduzidos por Harrison em 1907, enquanto avaliava a origem das fibras nervosas (HARRISON et al., 1907). Placas de 96 poços têm sido muito utilizadas para ensaios de toxicidade; no entanto, placas de 384, 1536 e 3456 poços têm sido desenvolvidas com objetivo de reduzir os custos e tempo de cultivo, sendo aplicadas em plataformas de triagem de alto desempenho (HTS – do inglês *high throughput screening*) (ZHAI et al., 2019).

Apesar de sua ampla aplicação e facilidade de uso, resultados discrepantes têm sido obtidos nos sistemas de cultivo celulares 2D tradicionais, quando comparado aos obtidos em modelos *in vivo*. Acredita-se que esses sistemas podem não refletir o ambiente natural devido à ausência da organização tridimensional (3D) do tecido nativo, limitada interação célula-célula e célula-matriz extracelular, limitada função tecido específica, diferente morfologia e polaridade e, alteração na expressão de receptores e fatores de crescimento como, por exemplo, o fator estimulante de colônia 1 (FEC-1), que induz os macrófagos a produzirem o fator de crescimento epidérmico (FCE), que está intimamente relacionado ao crescimento, migração e proliferação das células cancerígenas (YIN et al., 2019)(XIN et al., 2019)(BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013) **(Figura 1).**



Figura 1: Representação esquemática da organização e interação celular dos sistemas de cultivo celular em monocamada (2D) e em modelo *in vivo.*

Fonte: Autoria própria

Culturas com mais de um tipo celular presentes em compartimentos únicos (co-cultura) ou separados (placas transwell), vêm sendo utilizadas para tentar minimizar algumas das limitações dos sistemas de cultivo celulares 2D (JAROCH; JAROCH; BOJKO, 2018). Nos últimos anos, a co-cultura de células tumorais com células estromais (incluindo fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, células T regulatórias, dentre outras) e componentes da matriz-extracelular, vêm atraindo grande interesse devido ao seu importante papel na progressão, função e resposta do tumor (SANT; JOHNSTON, 2017)(LUO et al., 2016). As células mesenguimais influenciam importantes aspectos dos tumores, tais como transição epitéliomesênquima, resposta regulatória imune, conversão de fibroblastos "normais" em fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e metástase (FERREIRA; GASPAR; MANO, 2018). Já os fibroblastos, apresentam importante papel na adesão e metastáse tumoral (SUH et al., 2014), devido ao recrutamento de células progenitoras endoteliais (CPEs) para o interior dos tecidos, bem como progressão do câncer devido à remodelação dos componentes da matriz-extracelular e secreção de quimiocinas como o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) (XIN et al., 2019). No entanto, embora este seja um modelo mais complexo, ainda não exibe a organização 3D encontrada no ambiente nativo (JAROCH; JAROCH; BOJKO, 2018).

1.2. Sistemas de cultivo celular tridimensionais (3D)

Devido às limitações citadas anteriormente para os sistemas de cultivo 2D, tanto a comunidade científica quanto as agências regulatórias têm buscado ensaios mais eficientes para avaliar a eficácia e toxicidade de fármacos (SCOTT; PETERS; DRAGAN, 2013). Os primeiros ensaios relacionados à cultura 3D datam de 1975, quando os pesquisadores Rheinwald e Howard Green cultivaram um tecido similar ao encontrado in vivo em várias camadas a partir de queratinócitos humanos em associação com fibroblastos (linhagem 3T3)(RHEINWALD; GREEN, 1975). Desde então, os sistemas de cultivo 3D vêm sendo cada vez mais estudados, uma vez que reproduzem diversas características do tecido nativo, tais como: (i) heterogeneidade celular; (ii) interação célula-célula e célula-matriz extracelular; (iii) sinalização célulacélula; (iv) perfil de expressão gênica; (v) estrutura interna formada por diferentes camadas; (vi) perfil de crescimento celular e (vii) perfil de resistência à fármacos (COSTA et al., 2016). Além de predizerem de maneira mais fidedigna as características celulares in vivo, os sistemas de cultivo 3D devem idealmente garantir a reprodutibilidade em longo prazo através do controle do microambiente celular (parâmetros biológicos, físicos e químicos), além de apresentarem facilidade de uso, baixo custo e reduzido tempo de cultivo (LEMKE et al., 2015). A Tabela 1 apresenta as principais diferenças entre os sistemas de cultivo celular 2D e 3D.

	2D	3D
Morfologia	Planar	Tridimensional
Contato célula-célula	Reduzido contato celular	As células apresentam um contato celular similar ao encontrado ao ambiente <i>in vivo</i>
Expressão gênica	Frequentemente diferente dos padrões de expressão gênica <i>in</i> <i>vivo</i>	Mais próximo ao encontrado nas células e tecidos <i>in vivo</i>
Proliferação Celular	Geralmente as células apresentam uma taxa de proliferação maior do que observado <i>in vivo</i>	Geralmente apresentam uma menor taxa de proliferação, quando comparado ao cultivo em 2D
Distribuição de nutrientes, meio de cultura e fármacos	As células recebem igual distribuição de nutrientes, meio de cultura e fármacos	Diferentes gradientes de distribuiçãode nutrientes, meio de cultura e fármacos
Resposta a fármacos	Os fármacos são mais efetivos quando comparado ao ambiente <i>in</i> <i>vivo</i>	São mais resistentes do que o cultivo 2D, sendo mais próximo ao comportamento observado <i>in vivo</i>

Tabela 1: Principais diferenças entre os sistemas de cultivo celular 2D e 3D.

Fonte: Adaptado de PARIDAH et al., 2016; EDMONDSON et al., 2014.

7

Estima-se que nos últimos 10 anos, 200 milhões de dólares tenham sido destinados às pesquisas envolvendo os sistemas de cultivo celular 3D (HARTUNG, 2014). Diferentes aplicações estão associadas à sua utilização, tais como: estudos do câncer, desenvolvimento de fármacos, engenharia de tecidos e órgãos artificiais devido à melhor capacidade regenerativa desses sistemas, dentre outros (KIM et al., 2019a).

Os sistemas de cultivo celular 3D podem ser classificados entre: (i) livres de scaffolds - formados apenas por células sem o uso de nenhum suporte, (ii) baseados em scaffolds - cujas células são ancoradas ou encapsuladas em um determinado biomaterial que mimetiza a interação celular com componentes da matriz combinação extracelular. (iii) híbrido de técnicas como а micro е nanoencapsulação que utilizam a obtenção da agregação celular em uma abordagem livre de scaffolds, com a mimetização da matriz extracelular dos sistemas baseados em scaffolds e (iv) sistemas microflídicos - dispositivos que permitem a recapitulação do microambiente in vivo, pela contínua perfusão de meio de cultura e comunicação celular (FERREIRA; GASPAR; MANO, 2018)(ROOSENS; PUYPE; CORNELISSEN, 2017).

1.2.1. Sistemas de cultivo 3D livres de scaffold

Os sistemas de cultivo 3D livres de *scaffolds*, também conhecidos como esferoides, são caracterizados por microaglomerados celulares, sendo um dos mais comuns e versáteis métodos de cultura 3D (MEHTA et al., 2012). Sua utilização iniciou na década de 1970, à medida que pesquisadores buscavam modelos fisiologicamente mais fidedignos aos tecidos e órgãos *in vivo* (ONG et al., 2018).

A organização celular dos esferoides mimetiza os tumores sólidos, uma vez que podem apresentar diferentes camadas celulares de acordo com o tamanho dos esferoides: (i) camada externa formada por células em proliferação; (ii) camada secundária formada por células em senescência e (iii) camada mais interna composta por uma região necrótica. O acúmulo de lactato no interior do esferoide é responsável pela acidificação da camada interna (pH 6,5 a 7,2), o que também é encontrado no tumor nativo (COSTA et al., 2016). Além disso, os esferoides podem reproduzir as características tumorais devido aos diferentes gradientes de nutrientes

e oxigênio (0₂), acúmulo de catabólitos e gás carbônico (C0₂), perfil de crescimento e acesso aos fármacos (SANT; JOHNSTON, 2017) **(Figura 2).**



Figura 2: Organização estrutural dos esferoides que mimetizam um tumor nativo devido à formação de diferentes camadas celulares: (i) proliferativa, (ii) senescente e (iii) necrótica

Fonte: Autoria própria.

Em função de sua representatividade, diversos estudos utilizando esferoides formados por células tumorais em monocultura ou em cultivo com outras células vêm sendo estudados (LASCHKE; MENGER, 2017)(METZGER et al., 2011). Entretanto, assim como qualquer sistema, os esferoides também apresentam limitações que precisam ser consideradas durante o cultivo celular, tais como possibilidade de compatibilidade plataformas HTS escalonamento е com (ONG et al.. 2018)(LASCHKE; MENGER, 2017)(MEHTA et al., 2012). Além disso, nesse sistema, há um contato reduzido com componentes da matriz-extracelular, que devem ser produzidos pela própria célula durante o cultivo (COSTA et al., 2016).

A formação dos esferoides ocorre de maneira espontânea em ambiente onde as interações célula-célula se sobrepõem às interações célula-matriz extracelular (SAMBALE et al., 2015). Diferentes técnicas podem ser utilizadas para formação dos esferoides, tais como: (i) estática - flutuação forçada (FF), *hanging-drop* (HD) ou gota suspensa e (ii) dinâmica - cultivos agitados (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

1.1.2.1. Flutuação forçada

A técnica da flutuação forçada (FF) é baseada na formação dos esferoides devido ao impedimento da adesão celular em superfícies não aderentes (HUANG; GAO, 2018). Diferentes materiais hidrofílicos e neutros podem ser utilizados, dentre eles o ágar, a agarose e o poli-hidroximetacrilato (poli-HEMA), uma vez que inibem

as interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a superfície celular e a placa de cultura (METZGER et al., 2011). Neste método, geralmente são empregadas placas de 96 poços que podem ser previamente revestidas pelo próprio manipulador ou adquiridas já com o revestimento para prevenir a adesão celular. O revestimento da placa pelo manipulador, embora seja uma alternativa mais barata às placas disponíveis comercialmente, envolve um maior tempo de processo, já que são necessárias a dissolução e esterilização do material a ser utilizado (GUPTA et al., 2016). Placas comerciais previamente revestidas de ultra-baixa aderência (ULA - do inglês *ultra-low attachment*) têm sido muito utilizadas (ANTUNES et al., 2019). Estas placas são tratadas com um material hidrofílico e neutro, ligado covalentemente à superfície de poliestireno da placa, permitindo assim a formação e crescimento dos esferoides ao longo da cultura (SANT; JOHNSTON, 2017) **(Figura 3).**





Suspensão Celular Formação de um único esferoide

Fonte: Autoria própria.

Esta técnica apresenta as vantagens de simplicidade e ajuste do diâmetro dos esferoides formados, de acordo com a concentração celular utilizada (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Placas de 384 poços também são comercialmente disponíveis, apresentando melhor compatibilidade com plataformas *HTS* (SANT; JOHNSTON, 2017) (JUSTICE; BADR; FELDER, 2009). Além disso, essa técnica permite o cultivo dos esferoides em co-cultura utilizando diferentes tipos celulares (VADIVELU et al., 2015). **A Tabela 2** apresenta alguns estudos envolvendo a obtenção de esferoides pela técnica da flutuação forçada.

Introdução

_ 10

Tabela 2: Diferentes estudos envolvendo	a obtenção de esteroides p	pela tecnica da flutuação forçada	·
Células	Material utilizado	Resultado	Referência
Células estromais de medula óssea	Placas ULA	Robusta diferenciação osteogênica e elevada atividade de fosfatase	AGUILAR et
	(96 poços fundo	alcalina nos sistemas de cultivo 3D.	al., 2019
	redondo)		
Diferentes linhagens tumorais de	Placas de 96 poços-	Maior resistência aos fármacos doxorrubicina e gentamicina dos	SVIRSHCHEV
pâncreas (ASPC-1, BxPC-3 MiaPaCa-	fundo chato pré-	esferoides formados pelas células BxPC-3, T ₃ M ₄ .	SKAYA et al.,
2, PANC-1, COLO -357 e T ₃ M ₄)	revestidas com poli-		2019
	HEMA		
Linhagem de câncer de bexiga (RT4)	Placas ULA	Melhor recapitulação do ambiente <i>in vivo</i> , bem como maior	AMARAL et al.,
	(96 poços fundo	resistência à doxorrubicina (IC ₅₀ 1,0 μg/mL), em comparação ao	2017
	redondo)	sistema de cultivo em 2D (IC ₅₀ 0,39 μ g/mL).	
Linhagem de câncer de ovário	Placas de Petri pré-	Associação entre o perfil de resistência à cisplatina e expressão de	CHOWANADIS
(OVCAR-8 e OVCAR-8R)	revestidas com agarose	diferentes genes (APOE, BTG2, CTSA, FLNC, MEIS1, SPOCK1,	Al et al., 2016
		LGI2, dentre outros) dos sistemas de cultivo 3D e amostras	
		depaciente com baixo prognóstico.	
Linhagem de câncer de mama (MCF-7)	Placa de 96 poços	Maior resistência das culturas em 3D após exposição ao fármaco	ZHANG et al.,
	fundo redondo pré-	doxorrubicina.	2016
	revestida com agarose		
Linhagens de câncer de colo retal (HT-	Placa de 96 poços	As co-culturas 3D apresentaram aumento da expressão dos genes	KIM; LEE;
29 e DLD-1) e fibroblastos (CCD-18co e	fundo redondo pré-	α-SMA, EGFR e CTGF; e redução da expressão da β -catenina e E-	KUH, 2015
WI-38)	revestida com agarose	caderina, bem como melhor mimetização da capacidade invasiva	
		das células tumorais em estágios iniciais da doença.	
Diferentes linhagens de câncer de	Placas ULA	Melhor expressão de genes relacionados ao crescimento e resposta	EKERT et al.,
pulmão (H292, H1299, A549, H1993,	(96 poços fundo	tumoral (EGFR e cMET), em comparação ao cultivo em 2D.	2014
HCC4006, H1650, HCC2935 e H1975)	redondo)		
Linhagens de câncer de mama (MCF-	Placas ULA	Sensibilidade seletiva aos fármacos testados (lapatinibe, gefinitibe,	HOWES et al.,
10A) e epitelial (BT-474), fibroblastos	(96 poços fundo	desatinibe, vinblastina e vinorelbine) das células tumorais em co-	2014
humanos (Hs.58) e células endoteliais	redondo)	cultura 3D, comparado ao sistema de cultivo 2D, compatível com	
(HUVECs)		uma plataforma mais robusta para HTS.	
Linhagens de neuroblastoma humano	Garrafas de cultura T-	Maior perfil de expressão proteínas (HS-90, HSC 70, HSP 60 –	KUMAR et al.,
(SK-N-AS, SK-N-DZ e IMR-32)	75 cm ² pré-revestidas	estresse celular, PGAM1 e TP-1 e Pin-1 – glicólise, dentre outras) no	2008
	com poli-HEMA	sistema de cultivo 3D.	

Tabala 0. Difa volucionale o obtainação do cofereidos note técnico do flut ão forcado

1.2.1.2. Hanging-drop ou gota suspensa

A técnica *hanging-drop* (HD) ou gota suspensa foi desenvolvida em 1994 (DRAHANSKY et al., 2016), induzindo a formação dos agregados celulares por meio da força gravitacional (NAGELKERKE et al., 2013). Neste sistema, as células ficam suspensas na interfase ar/líquido na extremidade de uma gota de meio de cultura, permitindo a formação dos esferoides devido à tensão superficial que mantem a gota imóvel após inversão da placa (KELM et al., 2003)(GUPTA et al., 2016). Placas de Petri foram utilizadas inicialmente para formação da gota; no entanto, mais recentemente, placas disponíveis comercialmente têm sido utilizadas (NATH; DEVI, 2016). A placa Perfecta[®] 3D da Biomatrix com 96 ou 384 poços (ASTASHKINA; GRAINGER, 2014), possui um reservatório de líquidos que impede a evaporação da gota ao longo do cultivo (VADIVELU et al., 2015) **(Figura 4).**





Fonte: Autoria própria

Essa técnica é relativamente simples e, assim como o método de flutuação forçada, esferoides com pouca variabilidade de tamanho podem ser obtidos de acordo com a quantidade de células e tempo de cultivo estabelecido (GUPTA et al., 2016). No entanto, algumas limitações estão associadas à sua utilização como o pequeno volume utilizado para formação da gota (20-50 µL), que dificulta a troca de meio de cultura uma vez que a força peso que suporta a manutenção da gota supera a tensão superficial e a resultante deixa de ser nula e passa ser positiva para baixo (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013); necessidade de transferência para outra placa para que os outros ensaios possam ser realizados (AMARAL et al., 2017) e maior tempo de processo (ACHILLI et al., 2011). A **Tabela 3** apresenta alguns estudos envolvendo a obtenção de esferoides pela técnica *hanging-drop*.

Introdução

Tabela 3: Diferentes estudos envolvendo a obtenção de esferoides pela técnica hanging-drop ou gota suspensa

Células	Material Utilizado	Resultado	Referência
Células humanas de	Placa HD Perfecta	Os esferoides exibiram capacidades invasivas e proliferativas compatíveis	ORAIOPOULOU
glioblastoma (T98G)	3D [®] Biomatrix	como plataforma para ensaios in vitro 3D com células de glioblastoma.	et al., 2019
Diferentes linhagens	Placa HD (Nunc)	Esteroides apresentaram maior infecção (adenovirus, HSV-1 e	ROSELLINI et al.,
	96 poços	cilomegalovirus) e rapida produção de antigenos, quando comparado as	2019
CaCO2, KB, HOH-7, VERO		culturas em 2D.	
Linhagem de câncer	Placa HD Perfecta	Translocação do recentor DXP do citoplasma para o púcleo e conseguente	
henático (HenG2)	3D [®] Biomatrix	aumento da expressão do gene CVP3A4 no sistema 3D obtido, em	2017
	96 pocos	comparação à cultura em 2D.	2011
Células de adenocarcinoma	Placa HD 96 poços	Formação de esferoides uniformes para todas as linhagens avaliadas.	WARE et al., 2016
de pâncreas (PANC-1,	1 3	Reprodutibilidade dos esferoides obtidos para utilização como modelo para	,
AsPc-1, BxPC-3, Capan-1 e		avaliar a resposta e biologia tumoral e para o desenvolvimento de tecidos	
MIA PaCa-2)		bio-artificiais.	
Linhagens de câncer de	Placa HD (<i>XCentric</i>	Formação de esferoides viáveis e bem compactados e maior resistência à	RAGHAVAN et al.,
ovário (A2780 e OVCAR-3)	Mold and Engineering)	cisplatina (70-80%), em comparação ao cultivo 2D (30-50%).	2015
	384 poços		
Células humanas de	Placa HD (InSphero	Maior resistência dos cultivos 3D, quando comparado ao cultivo em 2D, para	RIMANN et al.,
osteosarcoma (SaOS-2,	AG)	os fármacos doxorrubicina, cisplatina, taurolidine e taxol. Heterogeneidade	2014
HOS eMG-63)		histológica compatível com o ambiente in vivo.	
Diferentes linhagens	Placa HD 384 poços	Esteroides obtidos permitiram a aplicação em plataforma HTS, com robusta	HSIAO et al., 2012
celulares (ES-D3, HepG2,		utilização de metodos fluorescentes e colorimetricos, bem como	
LUS7, DU145, PC-3,		possibilidade de cultivo com diferentes tipos de celulas.	
	Tampa da placa do	Esforcidos aiustávois do acordo com o quatidado colular utilizada o	MET7GER at al
osteoblastos (HOB)	Petri	possibilidade de formação da co-cultura com as três células utilizadas	
fibroblastos (NHDE) e	i cui	demonstrando a promissora utilização da metodologia empregada para	2011
endoteliais (HDMEC)		formação dos esferoides.	
Linhagem de coloretal	Tampa da placa de	Visualização da permeabilidade de pulsos elétricos nas diferentes camadas	WASUNGU et al
humana (HCT 116)	Petri pré-revestida	dos esferoides, bem como melhor relevância dos modelos 3D obtidos com o	2009
· · · · · ·	com ágar	ambiente <i>in vivo</i> para terapia gênica, quando comparado ao cultivo em 2D.	

____12

1.2.1.3. Cultivos agitados

A produção de esferoides utilizando cultivos agitados pode ser efetuada em dois tipos de biorreatores: (i) biorreatores do tipo tanque agitado ou *spinner* e (ii) biorreatores de parede rotativa, que favorecem o contato célula-célula devido ao impedimento da adesão celular às paredes dos sistemas que apresentam continua movimentação (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Frascos *spinner*, um modelo simplificado do biorreator tanque agitado, foram extensamente utilizados na geração de esferoides multicelulares em grande escala na década de 70. Sutherland e colaboradores (1970) utilizaram estes frascos para a obtenção de esferoides com diâmetro em torno de 200 µm com células de pulmão de hâmster chinês (linhagem V79), que apresentaram maior similaridade com estruturas nodulares de camundongos de linhagem C3H, além de maior resistência à radiação (SUTHERLAND et al., 1970).

Nos biorreatores tanque agitados, a agitação proveniente do impelidor mantêm as células em suspensão juntamente com o meio de cultura, propiciando um fluxo que auxilia no transporte de nutrientes, bem como diluição de catabólitos produzidos pelos esferoides (JONG, 2005). Nos biorreatores de parede rotativa, que foram desenvolvidos pela *NASA* (*National Aeronautics and Space Administration*) em 1992, o movimento da suspensão celular é mantido pela rotação da parede do equipamento para mimetizar a microgravidade e proporcionar às células um ambiente de baixo cisalhamento (**Figura 5**) (ALESHCHEVA et al., 2016)(BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Figura 5: Representação esquemática da formação dos esferoides utilizando diferentes técnicas de cultivo agitados, sendo: **(A)** Biorreatores tanque agitados (*spinner*) e **(B)** Biorreatores de parede rotativa (exemplo *STLV- Synthecon,* Houston, Texas).



Fonte: Adaptado de BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013.

A baixa taxa de cisalhamento protege as células de danos que podem ocorrer em função do excesso de agitação, previne a dissociação das células dos microcarregadores durante o cultivo (no caso dos sistemas baseados em scaffolds), mimetiza o ambiente in vivo pela promoção da diferenciação celular à medida que ocorre o contato e sinalização entre as células e, recapitula o fenótipo de diferentes tecidos, dentre eles o neuronal (NHNP), pulmonar (HBTC, BEAS-2B), cólon (CaCo-2), intestinal (INT-407) e hepático (Huh7) (GARDNER; HERBST-KRALOVETZ, 2016). Existem dois subtipos relacionados ao biorreator de parede rotativa: (i) STLVdo inglês slow-turning lateral vessel e (ii) HARV – do inglês high-aspect ratio vessel, que apresentam volumes de 55 à 500 mL. O biorreator do tipo STLV, comercialmente disponível (Synthecon, Houston, Texas) é formado por dois cilíndros concêntricos, na qual o interno é composto por uma membrana de silicone por onde ocorre o transporte de 0₂ e nutrientes, enquanto o externo contém o meio de cultura com as células em suspensão (KUMAR; STARLY, 2015). Já o HARV é uma derivação do biorreator do tipo STLV, uma vez que foi desenhado para propiciar o melhor o transporte de 0_2 ao longo da cultura. Nesse biorreator, o transporte de 0_2 e nutrientes ocorrem pela base e, em comparação ao biorreatotor do tipo STLV, apresenta um aumento da área superficial do cilindro, pela redução da altura e aumento do diâmetro (CHEN; HU, 2006).

Os cultivos agitados apresentam como vantagens o cultivo de esferoides em longo prazo (MEHTA et al., 2012); facilidade de acesso aos esferoides produzidos, melhor transporte de nutrientes e 0₂, devido à movimentação da cultura, e possibilidade de ajuste da velocidade de rotação para obtenção de uma determinada condição de cultivo (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). No entanto, não há o controle do tamanho e forma dos esferoides formados, fazendo com que o efeito do fármaco seja de difícil predição (NAGELKERKE et al., 2013). Além disso, a utilização de equipamentos especializados é indispensável e, no caso dos biorreatores do tipo *spinner*, as células susceptíveis às forças de cisalhamento podem sofrer danos ao longo da cultura (MEHTA et al., 2012). A **Tabela 4** apresenta alguns estudos envolvendo a obtenção de esferoides utilizando técnicas de cultivo agitados.

Introdução

Tabela 4: Diferentes estudos envolvendo a obtenção de esferoides utilizando técnicas de cultivo agitados

Células	Biorreator	Resultados	Referência
Linhagens de câncer de	Biorreator do tipo	Os esferoides foram mais resistentes após exposição Hipericina, quando comparado ao	KHOT et al.,
colon retal (H129 e	spinner	cultivo em 2D. Além disso, os esferoides apresentaram maior expressão do gene ABCG2	2018
HCT116)	(2x10 [°] cels/mL)	(relacionado a resistencia ao farmaco).	
Diferentes linhagens de	Biorreator do tipo	Importância do controle da taxa de perfusão (1,3 ⁻¹ dia) e baixa taxa de 0_2 dissolvido (4%)	ABECASIS et
células embrionárias	spinner	para formação dos esteroides hiPSC. Aumento da taxa de crescimento (máximo 4,7x10°	al., 2017
pluripotentes humanas	$(0,2x10^\circ \text{ cels/mL e})$	cels/mL) e fator de expansão. Confirmação do fenótipo pluripotente durante a cultura	
(ChiPS C4, ChiPS C12,	0,5x10° céls/mL)	(proteômica) e possibilidade de escalonamento da cultura (fator de expansão de 1100 em	
ChiPS C15, ChiPS C18,		células viáveis em 11 días de cultivo).	
ChiPS C22, 4 hESC			
SA121, SA167, SA181 e			
SA461)			
Diferentes linnagens	Biorreator do tipo	Esteroides foram obtidos em grande numero (1000-1500 esteroides/mL) com	SANTO et al.,
Celulares (mama- MCF7,	spinner	características do tumor nativo (mortología, proliteração e gradiente de nipoxía). As co-	2016
B1474, HCC1954,	(0,2x10 cels/mL e	culturas com libroblastos apresentaram elevada viabilidade, demonstrando robustez e	
HCC 1806; pulmao- A549,	0,5XTU Cels/mL)	compatibilidade dos sistemas de cultivo 3D para pesquisas relacionadas ao cancer.	
П400, П 157, П 1650 е cólon, НТ20)			
	Pierrector de	Major expressão do marcadores do pluripatância como o Electoriza, hom como major	
derivadas de tecido	biorreator de	capacidada proliforativa o da diferenciação dos esfereidos. Além disso, guando	2015
adinoso humano	(microgravidade)	administrados em modelos <i>in vivo, os</i> esferoides apresentaram major capacidade	2013
adiposo numano	(1v10 ⁶ céle/ml.)	regenerativa, do que as células cultivadas em 2D	
l inhagem de melanoma	Riorreator do tipo	Esferoides foram formados com as cálulas B16E10 e HaCaT e demonstraram	MARRERO
(B16E10) e queratinócitos	HARV	crescimento, proliferação e síntese de componentes da matriz extracelular	MESSINA
humanos (HaCaT)	(microgravidade)	demonstrando sua capacidade de recapitulação <i>in vivo</i>	HELLER
	(moregrandado)		2009
Linhagem de câncer de	Biorreator do tipo	Os esferoides formados demonstraram aumento da expressão de marcadores epiteliais	CARTERSON
pulmão (A549)	STLV	específicos e diminuição da expressão de marcadores de câncer específicos. Além disso.	et al., 2005
	(microgravidade)	os esferoides apresentaram a produção de mucoglicoproteína e melhor afinidade para	,
	(5x10 ⁶ céls/mL)	muco-anticorpos (MUC1 e MUC5A), com maior resposta anti-inflamatória após infecção	
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	com <i>P. aeroginosa,</i> sugerindo a melhor representatividade desse modelo, em	
		comparação ao cultivo em 2D.	
Cultura primária de	Biorreator do tipo	Não houve limitação de 0 ₂ em esferoides acima de 100 µm. Além disso, esferoides com	GLICKLIS;
hepatócitos (ratos	spinner	diâmetro de 100 μm apresentaram máxima produção de albumina (60 μg/ milhões	MERCHUK;
Sprague-Dawley)	(5x10 ⁵ céls /mL)	células/dia).	COHEN, 2004

15

1.2.2. Sistemas de cultivo 3D baseados em scaffolds

Os sistemas de cultivo 3D baseados em *scaffolds* consistem na utilização de um material poroso aos quais as células são cultivadas (THOMA et al., 2014). Nesses sistemas, as células se agregam aos poros desses materiais, permitindo assim a formação e crescimento da estrutura 3D (SANT; JOHNSTON, 2017). Para mimetizar as funções biológicas da matriz extracelular, os materiais utilizados como *scaffolds* devem possuir alta porosidade e interconectividade entre os poros, para promover o transporte de nutrientes essenciais para o crescimento e a diferenciação celular, assim como integridade mecânica ao longo do cultivo celular (CUADROS; ERICES; AGUILERA, 2015). Em função disso, o tamanho do poro e a porosidade final do *scaffold* devem estar de acordo com a aplicação desejada (LOH; CHOONG, 2013). De acordo com o tamanho do poro, os *scaffolds* podem ser classificados entre: (i) microporosos - que são caracterizados pela adesão e crescimento das células somente na superfície do carreador e, (II) macroporosos - que permitem o crescimento celular em todo o material (interna e externamente) (KENNETH, CASTAN & LINDSKOG, 2018).

Em relação às suas características, os *scaffolds* devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e de fácil manipulação (LUKYANOVA et al., 2010), devendo apresentar estabilidade mecânica e baixa taxa de degradação ao longo do cultivo (CAMPODONI et al., 2019). No entanto, algumas desvantagens estão associadas à sua utilização como o desconhecimento da composição dos materiais de origem natural, que podem apresentar alta variabilidade e dificuldade de acesso às células no interior dos *scaffolds* (LAZZARI et al., 2018).

Diversos materiais têm sido utilizados para a formação dos *scaffolds* (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Os hidrogéis de origem natural como a quitosana, o colágeno, a gelatina, a laminina e o ácido hialurônico (OKAMOTO; JOHN, 2013)(MUKUNDAN et al., 2015), apresentam as vantagens de serem biocompatíveis, biodegradáveis, além de promoverem a adesão celular (OKAMOTO; JOHN, 2013). A gelatina é um dos hidrogéis mais utilizados como *scaffold* em função de sua biocompatibilidade, baixo custo e disponibilidade comercial (CAMPODONI et al., 2019). Já a quitosana, embora apresente similaridade com componentes da matriz da cartilagem, está associada com algumas limitações de uso como, por exemplo, perda da integridade em ambiente aquoso acidificado,

tornando necessária sua associação com outros biomateriais (FELFEL et al., 2019). Além destes, outros exemplos comercialmente disponíveis incluem o Matrigel[®], que é constituído por uma mistura de hidrogéis naturais como a laminina e o colágeno (MURPHY et al., 2017)(NATH; DEVI, 2016) e o Extracell[™], formado pela associação de ácido hialurônico e laminina (MALTMAN; PRZYBORSKI, 2010). Hidrogéis de origem sintética como a policaprolactona (PCL), ácido poli-lático (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e o ácido poli-vinil (PVA) também são utilizados no cultivo celular 3D (OKAMOTO; JOHN, 2013)(MUKUNDAN et al., 2015), devido à biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade, já que são eliminados do organismo de forma natural após hidrólise estrutural (OKAMOTO; JOHN, 2013).

Os peptídeos também são utilizados como *scaffolds* devido à sua capacidade em formar uma rede porosa com tamanho nanométrico, que apresenta propriedades mecânicas e estruturais semelhantes à matriz-extracelular natural (BETRIU; RECHA-SANCHO; SEMINO, 2018). Os *scaffolds* à base de peptídeos se organizam em estruturas micro e nanométricas por meio de interações fracas de Van de Walls ou pontes de hidrogênio, formando uma estrutura anfifílica pela intercalação de resíduos hidrofílicos (positivos ou negativos) e hidrofóbicos (BRUN et al., 2019). O primeiro peptídeo natural foi encontrado em uma proteína de levedura em 1990 (GELAIN; HORII; ZHANG, 2007), já os peptídeos sintéticos como o RADA16-I (Puramatrix[®]) e RADA16-II, que apresentam resíduos de arginina e ácido aspártico em substituição a lisina e glutamina, também têm sido desenhados e caracterizados como *scaffolds* (ZHANG; GELAIN; ZHAO, 2005).

Devido à sua estabilidade em diferentes faixas de pH, solubilidade aquosa e ausência de toxicidade, os polissacarídeos também são utilizados para a formação das culturas 3D (CUADROS; ERICES; AGUILERA, 2015). A agarose é um polissacarídeo natural obtido de algas marinhas com várias aplicações na engenharia tecidual como regeneração de cartilagem e tecido neuronal. No entanto, devido à baixa capacidade de adesão celular, é essencial sua associação com alguns hidrogéis como a quitosana (FELFEL et al., 2019). O alginato também é um polissacarídeo de origem natural derivado de algas marinhas, que vem sendo utilizado como *scaffold* devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, facilidade de geleificação e baixo custo (LI et al., 2019a)(TURNBULL et al., 2018)(SWIOKLO et al., 2017). A estrutura química do alginato é composta por duas unidades monoméricas de resíduos (M) β -D-ácido manurônico e (G) α -L-ácido

gulurônico (Figura 6) (ESTRADA et al., 2016). Variações nas concentrações entre essas unidades podem alterar as propriedades químicas e físicas do alginato, como sua capacidade de geleificação e porosidade (FERREIRA; GASPAR; MANO, 2018).

Figura 6: Estrutura química do alginato.



Fonte: Adaptado de ANDERSEN; AUK-EMBLEM; DORNISH, 2015.

Um dos mais comuns métodos para geleificação do alginato em solução é a sua combinação com cátions bivalentes. Os cátions bivalentes ligam-se às porções do α -L-ácido gulurônico, permitindo o *cross-linking* e formação da estrutura em gel por meio da junção entre as porções do α -L-ácido gulurônico adjacentes, resultando em um modelo conhecido como "caixa de ovo" (LEE; MOONEY, 2012) **(Figura 7).** Diferentes afinidades com os íons bivalentes são encontradas, de acordo com a sequência: Ca²⁺<Sr²⁺<Ba²⁺(ANDERSEN; AUK-EMBLEM; DORNISH, 2015).

A estrutura porosa do alginato permite a incorporação e retenção das células, difusão de nutrientes e O₂, bem como a eliminação de produtos do metabolismo celular (CAROLINE et al., 2017). Por isso, a microencapsulação em alginato tem sido utilizada para avaliar a interação entre as forças externas e os agregados tumorais, interação entre diferentes tipos celulares (ESTRADA et al., 2016), diferenciação, proliferação e sinalização celular, bem como vascularização tumoral (LEE; MOONEY, 2012).

Dependendo do tipo e material utilizado, duas técnicas podem ser empregadas para fabricação dos *scaffolds:* (i) plaqueamento celular em matrizes acelulares como, por exemplo, o Alvetex[®] (poliestireno) e o Algimatrix[®] (alginato) e (ii) dispersão das células em um material líquido, seguido por polimerização, como é o caso do Matrigel[®] (RIMANN; GRAF-HAUSNER, 2012). A **Tabela 5** apresenta alguns dos materiais utilizados como *scaffolds* disponíveis comercialmente.



Figura 7: Processo de geleificação do alginato em solução com íons cátions bivalentes.

Fonte: Adaptado de KÜHBECK et al., 2015.

Tabela 5. Diferences materiais disponibilizados comercialmente como scanolos
--

Nome comercial	Composição do material	Empresa
Matrigel [®]	Laminina e colágeno	BD
GEM [®]	Microcarregadores de	Global Cell Solutions/
	alginato	Hamilton
Extracel [™]	Ácido hialurônico e	Glycosan Biosystems
	colágeno	
Hydromatrix [®]	Peptídeo sintético	Sigma
Puramatrix [®]	Peptídeo	3DM Inc.
Geltrex [®]	Laminina e colágeno	Invitrogen
AlgiMatrix [®]	Alginato	Invitrogen
Ultra Web [®]	Poliamido	Conrning
MaPTrix HyGel [®]	Hidrogel quimicamente	Kollodis Biosciences
	definido	
MT 3D Matrix [®]	Poliestirenoglicol (PEG)	QGel
BIOFELT®	PGA, PLLA, PLGA	Synthecon Inc.
Biomerix 3D Scaffold [®]	Policarbonato de	Synthecon Inc.
	poliuretano-ureia	
3D insert PCL [®]	PCL	3DBiotek
3D insert PLGA [®]	PLGA	3DBiotex
3D insert PS [®]	PS (poliestireno)	3DBiotek

Fonte: Adaptado de ASTHANA; KISAALITA, 2013.

Diversos estudos têm sido realizados utilizando diferentes tipos de *scaffolds* para obtenção de estruturas celulares 3D, alguns deles estão apresentados na **Tabela 6.**

Tabela 6: Diferentes estudos envolvendo o cultivo celular 3D baseado em scaffolds

Células	Material	Resultados	Referência
Células mesenquimais	PLGA	Os scaffolds apresentam características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, além	CHEN et al.,
de medula óssea		de promoverem o aumento da expressão do gene BMP-12, relacionado à cicatrização	2019
		óssea, organização de cartilagem e aumento de fibrocartilagem.	
Linhagem celular de	Ácido poli-(L-lático-co-	Formação de estruturas 3D com diâmetros entre 300–450 nm com capacidade de adesão	TÜRKER;
fibroblastos de	ε-caprolactona)	às células 3T3. Confirmação da presença de colágeno nos scaffolds obtidos e aumento da	YILDIZ;
camundongos (3T3)	(PLLCL),	viabilidade celular proporcional à quantidade de colágeno adicionada aos sistemas 3D.	ARSLAN
	Polivinilpirrolidona (PV		YILDIZ,
	P) e colágeno		2019
Diferentes linhagens	Quitosana e Alginato	As três linhagens demonstraram crescimento independente da rigidez dos scaffolds. As	XU et al.,
de câncer de próstata		culturas de próstata não alteraram seu fenótipo após associação com os scaffolds,	2019
(PC3) e osteoblastos		enquanto as linhagens de osteoblastos mineralizaram-se.	
(C4-2B e 22RV1)			
Células endoteliais	AlgiMatrix [®] e Geltrex [®]	As células cultivadas em 3D exibiram menor estresse oxidativo com maior produção das	BEHARRY
humanas de retina		protaglandinas (PGE e PGI) em ambiente de hipóxia intermitente, demonstrando a	et al., 2018
(linhagem ACBRI-181)		capacidade de recapitulação in vivo destes sistemas, podendo ser utilizados para o drug	
e celulas de astrocitos		screening de diversos compostos para tratamento do sistema ocular.	
humanas de retina			
(181)			
Celulas do tipo	PLGA,	A incorporação de colageno ao <i>scattold</i> promoveu o aumento da secreção de albumina,	BROWN et
nepatocitos		ureia e enzimas CYP (fold-4) em nepatocitos numanos em duas semanas de cultivo, em	al., 2018
	e Matrigel ⁻)	comparação a scattolas de PLGA não modificados. Esses indices também foram elevados	
	RALL CONTRACTOR	quando comparado a scanolos associados a libronecuna ou Matriger	
	Matrigel	Propriedades dos tecidos dos bronquios indicativas do trato respiratorio	CHEN et al.,
numanas de vias		(biomarcadores:CK5, 20-1 e PCK) foram observados has culturas em 3D, em comparação	2018
areas	Ouite e en e	as culturas em 2D. Meior encerimente colular fei obtida en 6205 dies de culture. Al ém diese es recultados	
Celulas primarias de	Quitosana	Maior crescimento celular foi obtido apos 35 días de cultura. Alem disso, os resultados	
(Nibdf) a liphagapa da		demonstraram que os scanolos 30 meinoraram a qualidade do tecido restaurado em	2018
		modelos animais, em relação ao grupo que recebeu o material comercial.	
		Diminuição do diâmotro do cooffold com o cumonto do contoúdo do colégono. Estímulo do	
oniteliais de	FUL e colageno	Diminução do diametro do scanolo com o admento do conteudo de colageno. Estimulo da expressão de células de adesão (n.EAK) e de moléculas timopoéticas (II. 7 ocitoqueratina)	
comundondos (CPEC)		8) além da promoção da adesão e proliferação celulor	2015
camundongos (CREC)		o), alem da promoçaoda adesao e proliteração celular.	

— 20

1.2.3. Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos são baseados na combinação das metodologias para obtenção dos esferoides e a utilização de *scaffolds*, uma vez que esses materiais auxiliam na imobilização dos esferoides em uma posição determinada, promovendo uma geometria 3D definida (LASCHKE; MENGER, 2017). Geralmente, estes sistemas são obtidos pela encapsulação dos esferoides em suspensão com um biomaterial que mimetiza os componentes da matriz extracelular, possibilitando a obtenção de microcápsulas com uniformidade de tamanho e conteúdo (NATH; DEVI, 2016).

A encapsulação em alginato é uma técnica empregada para obtenção dos sistemas 3D híbridos, uma vez que a formação das cápsulas por ser facilmente obtidas pela polimerização das gotas de alginato em uma solução contendo cátions bivalentes (KIM et al., 2019b), conforme citado anteriormente. O tamanho da gota formada depende de vários fatores como: viscosidade e fuxo da solução de alginato, tamanho dos esferoides a serem encapsulados, técnica utilizada para formação da gota (exemplos: pipetas, seringas, encapsulador automático, dentre outros) e voltagem aplicada durante a encapsulação (elevada voltagem produz cápsulas menores) (ANDERSEN; AUK-EMBLEM; DORNISH, 2015).

A encapsulação em alginato permite a imobilização das células no interior do hidrogel, pretegendo-as de estresse mecânicos ao longo do cultivo, propiciando melhor viabilidade e manutenção da cultura a longo-termo (DHAMECHA et al., 2019). No entanto, assim como qualquer metodologia, algumas limitações estão associadas com sua utilização, tais como: necessidade de padronização das condições de encapsulação para cada tipo celular; dissolução da cápsula de alginato dependendo do tipo de análise a ser realizada, o que inviabiliza sua utilização em futuros ensaios; além da reduzida interação com algumas células de mamíferos, sendo necessária a co-utilização com peptídeos como o RGD (arginina-glicina e ácido aspártico) (REID; PERMUTH; SELLERS, 2017).

1.2.4. Sistemas microfluídicos

O sistema microfluídico apresenta melhor predição da resposta celular a diferentes compostos, uma vez que recria um elevado nível de funcionalidade *in vitro*

pela continua perfusão de meio de cultura (YU; CHOUDHURY, 2019)(MARIN et al., 2019), mimetizando as forças de cisalhamento do fluxo sanguíneo e a comunicação celular (LANGHANS, 2018).

Além de requerer um baixo volume de meio de cultura (SANTBERGEN et al., 2019), vários parâmetros são avaliados e controlados durante o cultivo nesses sistemas, tais como: razão célula-líquido; taxa de 0₂, CO₂ e nutrientes; força de cisalhamento induzido pelo fluxo do líquido; gradiente de concentração de subprodutos provenientes do metabolismo celular e nível de integridade celular, uma vez que a área de cultivo nesses dispositivos é muito menor quando comparado ao sistema *transwell*. A presença de eletrodos ou sensores embutidos ao sistema pode agregar um maior custo a esse processo (TIAN et al., 2019). A **Figura 8** demonstra alguns exemplos de sistemas microfluídicos baseados no cultivo celular 3D.

Figura 8: Representação esquemática de diferentes sistemas microfluídicos utilizados como cultivo 3D. (A) Sistema microfluídico baseado em células HepG2, monócitos, células T e hidrogel. (B) Sistema microfluídico baseado em modelo hepático e intestinal (C) Sistema microfluídico utilizando células pulmonares em uma membrana elástica que recapitula os movimentos respiratórios dos alvéolos pulmonares.



Fonte: Adaptado de TIAN et al., 2019; MARIN et al., 2019; LEE et al., 2018b

A **Tabela 7** apresenta alguns estudos relacionados ao cultivo celular 3D nos sistemas híbridos e microfluídicos.

Introdução

- 23

 Tabela 7: Diferentes estudos envolvendo a obtenção o cultivo celular 3D baseados nos sistemas híbridos e microfluídicos.

Sistemas híbridos			
Células	Material utilizado	Resultados	Referência
Células epiteliais	Esferoides em placas	Os modelos obtidos foram capazes de associar diferentes tipos celulares, além de	BOGORODS
tumorais de mama	ULA em incorporação	melhor recapitulação do tecido <i>in vivo.</i>	KAYA;
(MDCK e DA-MB-231)	com colágeno e PEG		MCLANE;
			LIGON, 2019
Células mesenquimais	Esferoides em placas	Os esferoides encapsulados mostraram melhor proliferação, bem como aumento da	HEO;
e endoteliais humanas	AggreWell [®] em	expressão de fatores de regulação osteogênica, com formação de redes pré-vasculares,	HOSPODIUK;
(MSCs e HUVECs)	encapsulação com	podendo ser utilizados como modelo para a engenharia de tecidos ósseos.	OZBOLAT,
	colágeno/fibrina		2019
Células de câncer de	Esferoides em	Os sistemas 3D obtidos foram capazes de recapitular o ambiente natural <i>in vivo</i> , devido	REBELO et
pulmão (linhagem	biorreatores do tipo	ao acúmulo de citocinas (IL4, II10, IL13, CCl22, CCL24 e CXCL1), além de componentes	al., 2018
H157), monócitos	spinner encapsulados	da matriz extracelular (colágeno e fibronectna), metaloproteinases (MMP-1 e MMP-9),	
(THP-1) e fibroblastos	com alginato	bem como a expressão de CD68, CD163 e CD206. Além disso, houve redução de	
(CAFs)		macrófagos M2, após tratamento com cisplatina e paclitaxel.	
Linhagem celular de	Esferoides em	A cultura foi mantida viável por 15 dias. A presença dos fibroblastos resultou em	ESTRADA et
câncer de mama	biorreatores do tipo	secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, CXCL-1). Além disso, foi observada	al., 2016
(MCF-7) e fibroblastos	spinner encapsulados	redução no receptor de estrogênio e E-caderina, bem como aumento da migração celular	
humanos (HDFs)	com alginato	e da angiogênese das co-culturas obtidas, demonstrando a melhor capacidade preditiva	
		desses modelos.	
Sistemas microfluídicos			
Células	Material utilizado	Resultado	Referência
Linhagem de de	Microchip 4 canais	A presença das camadas dos polímeros (alginato e quitosana) promoveu a melhor	LIU et al.,
câncer hepático	(tamanhos de 50/60,	adesão das células HepG2, mantendo sua viabilidade, proliferação e função hepática	2019
humano (HepG2)	150/190, 250/370,	durante 10 duas de cultura, demonstrando a capacidade dos sistemas 3D no campo da	
	800/1150 µm)/alginato	engenharia tecidual.	
	e quitosana		
Células de	Microchip	As células interior dos sistemas microfluídicos apresentaram-se viáveis por 3 semanas,	ROSSER et
condrócitos equinos	(3 mm de diâmetro,	com baixa atividade metabólica e elevada expressão de Sox9 e Col2 (genes	al., 2019
	volume 7,5 µL,	relacionados a condrócitos articulares). Além disso, os sistemas 3D obtidos	
	microcapilares de 21,5	demonstraram capacidade de recapitulação da cartilagem natural e resposta bioquímica	
	mm x1 mm e altura de	apos estresse, podendo ser utilizados para novos estudos envolvendo osteoartrite em	
	1 mm)	pacientes humanos e animais.	

24

A **Tabela 8** apresenta as principais vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de cultivo celular 3D.

	Vantagens	Desvantagens
Flutuação Forçada	Simplicidade; Facilidade de acesso aos esferoides produzidos; Homogeneidade de tamanho (dependendo da concentração celular utilizada); Compatível com plataforma <i>HTS</i> ; Possibilidade de obtenção de co- culturas;	Dificuldade de manutenção da cultura a longo-termo;
Hanging-Drop	Homogeneidade de tamanno (dependendo da concentração celular utilizada); Facilidade de acesso ao esferoide formado; Possibilidade de formação de co- culturas;	Pequeno volume de trabalho dificultando a troca de meio de cultura; Necessidade de transferência para uma placa tradicional para ensaios de citotoxicidade; Dificuldade de manutenção da cultura a longo-termo;
Cultivos agitados	Simplicidade; Possibilidade de ensaios <i>HTS</i> a longo prazo; Produção em larga escala; Fácil acesso aos esferoides formados, Melhor controle ao longo da cultura (ex. agitação, temperatura); Menor força de cisalhamento (biorreatores de parede rotativa);	Necessidade de equipamentos especializados; Maior custo de processo; Não há o controle do tamanho do esferoide formado; Células sensíveis às forças de cisalhamento podem sofrer danos (biorreatores do tipo spinners); Dificuldade de formação de co- culturas;
Baseados em Scaffolds	Promovem a mimetização dos componentes da matriz extracelular; Possibilidade de formação de co- culturas; Utilização de materiais de fácil manipulação; biocompatíveis e não- tóxicos;	Desconhecimento da composição de scaffolds de origem natural, que pode gerar maior variabilidade e dificuldade de acesso dos esferoides no interior dos scaffolds; Maior custo de scaffolds de origem sintética;
Híbridos	Imobilização das células no interior do <i>scaffold</i> ; Proteção das células contra estresse mecânico durante o cultivo; Manutenção da viabilidade da cultura a longo prazo;	Necessidade de padronização para cada tipo celular; Necessidade de dissolução da cápsula (<i>scaffold</i>), dependendo do ensaio a realizado; Baixa adesão celular de algumas células ao biomaterias utilizados (<i>scaffolds</i>); Maior custo de processo (dependendo do tipo de encapsulação)
Microfluídicos	Baixo volume de meio de cultura; Controle de diversos parâmetros ao longo da cultura (0 ₂ , CO ₂ , pH, nutrientes, integridade celular, força de cisalhamento, dentre outros)	Necessidade de equipamentos especializados, Maior custo de processo

 Tabela 8: Principais vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de cultivo celular 3D

Fonte: Adaptado de NATH; DEVI, 2016;BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013;MEHTA et al., 2012.

1.3. Câncer de Ovário

Em 2018, o câncer de ovário foi considerado o sétimo tipo de câncer mais comum, apresentando cerca de 240.000 novos casos. Depois do câncer de mama, o câncer de ovário representa a segunda maior causa de morte entre mulheres acima de 40 anos, principalmente em países desenvolvidos (STEWART; RALYEA; LOCKWOOD, 2019). Sua elevada taxa de mortalidade está frequentemente associada aos sintomas inespecíficos como dor abdominal, inchaço e fadiga, que dificulta o diagnóstico precoce da doença (MURARKA et al., 2019). Vários fatores têm sido associados ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de ovário, incluindo a terapia hormonal (estrógeno e sua associação com progesterona), endometriose e alta massa corporal (MALLEN; TOWNSEND; TWOROGER, 2018).

De acordo com o American Cancer Society (2018), o câncer de ovário pode ser classificado em diferentes estágios: **Estagio I**, as células cancerígenas encontram-se confinadas dentro dos ovários ou tuba de falópio. No **Estágio II**, as células cancerígenas encontram-se no ovário com disseminação para órgãos próximos como útero, cólon, bexiga e reto. Tanto no estágio I quanto no II, não ocorre disseminação para os linfonodos. No **Estágio III**, ocorre disseminação para órgãos fora da pelve e para os linfonodos retroperitoneais. Já no **Estágio IV**, as células tumorais disseminam-se para fora da cavidade peritoneal para outros tecidos ou órgãos, como baço ou fígado, além de gânglios linfáticos diferentes dos retroperitoneais (**Figura 9**) (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2018).

OVÁRIOS SADIOS	ESTÁGIO I	ESTÁGIO II	ESTÁGIO III	ESTÁGIO IV

Figura 9: Diferentes estágios de desenvolvimento do câncer de ovário

Fonte: Adaptado de National Ovarian Cancer Coalition Online.

O câncer de ovário pode apresentar origem em três tipos celulares diferentes, sendo o tipo epitelial responsável por mais de 90% dos casos malignos, seguido

pelo estromal que corresponde a 5-6% dos casos e germinativa que compreende apenas 2-3% dos casos. Os tumores malignos de ovário, também denominados de adenocarcinomas, apresentam elevada heterogeneidade e podem ser subdivididos em 5 tipos histológicos bem definidos: carcinoma seroso de alto grau (70% dos casos), endometrióide (10%), células claras (10%), mucinosas (3%) e seroso de baixo grau (menos de 5% dos casos) (STEWART; RALYEA; LOCKWOOD, 2019)(REID; PERMUTH; SELLERS, 2017).

O tratamento do câncer de ovário compreende primeiramente a remoção cirúrgica do tecido afetado, seguido por quimioterapia (STEWART; RALYEA; LOCKWOOD, 2019). O paclitaxel é um derivado taxano muito utilizado no tratamento do câncer de ovário, devido à sua capacidade de inibir a despolimerização dos microtúbulos, especialmente dos heterodímeros da β-tubulina, inibindo a replicação celular na fase G2/M, levando à morte celular por apoptose **Figura 10**)(KAMPAN et al., 2015). No entanto, em torno de 15-35% dos pacientes apresentam resistência ao tratamento proposto (WANG; LIU; ZOU, 2019)(ZHENG; LI, 2018), sendo a recorrênciado tumor um dos principais fatores relacionados a falha durante o tratamento do câncer de ovário (LI et al., 2019b).



Figura 10: Mecanismo de ação do Paclitaxel.

Fonte: Adaptado de FONG; DURKIN; LEE, 2019; KAMPAN et al., 2015.

5. Conclusões

Os estudos realizados nesse trabalho permitiram concluir que:

- Inicialmente, esferoides pouco compactos foram obtidos com as células SKOV-3 e OVCAR-3 utilizando as técnicas de FF e HD. No entanto, a centrifugação inicial da placa ULA na técnica FF assim como a adição de 0,25 e 0,5% (p/v) de MC ao meio de cultura propiciou a formação de esferoides mais compactos e regulares (esféricos) com diâmetros entre 200 e 500 µm;
- A técnica FF propiciou a formação de esferoides após 24 h de cultivo (SKOV-3 e OVCAR-3), enquanto a HD permitiu a formação de esferoides apenas após 72 h (SKOV-3) e 48 h de incubação (OVCAR-3). Além disso, quando comparado à técnica HD, a FF apresentou maior facilidade de manuseio e cultivo com melhor custo-benefício;
- As células SKOV-3 formaram esferoides com maior capacidade de compactação ao longo do cultivo, quando comparado às células OVCAR-3 (FF e HD), provavelmente em decorrência de seu maior potencial metastático;
- As co-culturas 3D (SKOV-3:MCU-9 e SKOV-3:CCD27-Sk) (FF) apresentaram a formação de esferoides com diâmetro entre 200 e 500 μm, com maior presença de microvilosidades e menor crescimento celular. Além disso, a cocultura 3D (SKOV-3:MCU-9)(FF) permitiu a formação de esferoides com melhor perfil tumorigênico, metastático e agressivo, devido ao perfil de expressão dos genes avaliados (MMP-2, MMP-9, HIF1-α, VEGF, SNAIL, ZEBI, vimentina e β-catenina), sugerindo melhor mimetização do microambiente tumoral *in vivo* nesse sistema;
- Em comparação aos sistemas estáticos (FF e HD), o sistema de cultivo agitado (biorreatores do tipo *spinner*) permitiu a formação de um maior número de esferoides ao longo do cultivo, com manutenção da viabilidade celular a longo prazo. No entanto, devido à fusão dos esferoides observada ao longo do cultivo, sua aplicação como plataforma *HTS* a longo-termo pode ser restrita;
- Assim como para os esferoides obtidos em sistema agitado, as cápsulas em mono (SKOV-3) e em co-cultura (SKOV-3:HDFs) mostraram viabilidade a longo prazo (28 dias de cultivo). Além disso, as cápsulas de alginato evitaram a fusão dos esferoides ao longo do cultivo, demonstrando a potencialidade

deste sistema para a produção em larga escala e estudos de citotoxicidade em longo prazo;

- Os sistemas de cultivo 3D na forma de esferoides obtidos pela técnica FF para a co-cultura formada entre as células SKOV-3 e células mesenquimais (SKOV-3:MCU-9) apresentaram melhores características de utilização para ensaios de toxicidade de fármacos em curto prazo;
- Todos os sistemas 3D obtidos demostraram maior resistência após exposição ao fármaco Paclitaxel, quando comparado ao sistema 2D;
- Embora não tenha sido observado um perfil dose-reposta para os sistemas 3D estáticos (FF e HD) após exposição ao fármaco Paclitaxel, as cápsulas em alginato 3D obtidos em sistemas agitados em monocultura (SKOV-3) e cocultura (SKOV-3:FDFs) permitiram o cálculo de IC₅₀, confirmando a maior resistência desses modelos, quando comparado ao sistema 2D, como esperado;
- Já os sistemas híbridos em co-cultura com fibroblastos humanos (SKOV-3:HDFs) apresentam melhores características para ensaios *drug screening* a longo prazo, em função da manutenção da viabilidade da cultura a longo termo, com melhor perfil dose-resposta.

Por fim, os estudos apresentados ao longo deste trabalho podem contribuir para consolidação e padronização de diferentes sistemas de cultivo celular 3D como plataforma para o *screening* de novos fármacos para o tratamento do câncer.

6. Referências Bibliográficas

ABECASIS, B. et al. Expansion of 3D human induced pluripotent stem cell aggregates in bioreactors: Bioprocess intensification and scaling-up approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 81–93, 2017.

ACHILLI, T.-M. et al. Quantification of the Kinetics and Extent of Self-Sorting in Three Dimensional Spheroids. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 18, n. 4, p. 302–309, 2011.

AGUILAR, I. N. et al. Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells using the Regenova printer: Spheroid characterization and osteogenic differentiation. **Bioprinting**, v. 15, n. October 2018, p. e00050, 2019.

ÅKERFELT, M. et al. Automated tracking of tumor-stroma morphology in microtissues identifies functional targets within the tumor microenvironment for therapeutic intervention. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 30035–30056, 2015.

AL-ALEM, L.; CURRY, T. E. Ovarian cancer: involvement of the matrix metalloproteinases. **Reproduction**, v. 150, n. 2, p. R55–R64, 2015.

ALESHCHEVA, G. et al. Scaffold-free Tissue Formation Under Real and Simulated Microgravity Conditions. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 119, p. 26–33, 2016.

AMARAL, R. L. F. et al. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. **Frontiers Physiology,** v. 8, n. August, 2017.

AMELIAN, A. et al. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 5, p. 861–870, 2017.

AMY Y. HSIAO, YI-CHUNG TUNGA, XIANGGUI QU, LALIT R. PATELA, KENNETH J. PIENTAD, A.; TAKAYAMA, S. 384 Hanging Drop Arrays Give Excellent Z-factors and Allow Versatile Formation of Co-culture Spheroids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 4, p. 1–19, 2014.

ANDERSEN, T.; AUK-EMBLEM, P.; DORNISH, M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. **Microarrays**, v. 4, n. 2, p. 133–161, 2015.

ANTUNES, J. et al. In-air production of 3D co-culture tumor spheroid hydrogels for

expedited drug screening. Acta Biomaterialia, v. 94, p. 392-409, 2019.

AREND, R. C. et al. The Wnt/β-catenin pathway in ovarian cancer: A review. **Gynecologic Oncology**, v. 131, n. 3, p. 772–779, 2013.

ASGHAR, W. et al. Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. **Materials Today**, v. 18, n. 10, p. 539–553, 2015.

ASTASHKINA, A.; GRAINGER, D. W. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 1–18, 2014.

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

ASTHANA, A.; KISAALITA, W. S. Biophysical microenvironment and 3D culture physiological relevance. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 11–12, p. 533–540, 2013.

BEHARRY, K. D. et al. Human retinal endothelial cells and astrocytes cultured on 3-D scaffolds for ocular drug discovery and development. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 134, n. September 2017, p. 93–107, 2018.

BEISSNER, N. et al. 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**, v. 126, p. 57–66, 2018.

BELAIR, D. G. et al. Engineering human cell spheroids to model embryonic tissue fusion in vitro. **Plos One,** v. 12, 2017.

BENAM, K. H. et al. Exploring new technologies in biomedical research. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 6, p. 1242–1247, 2019.

BETRIU, N.; RECHA-SANCHO, L.; SEMINO, C. E. Culturing mammalian cells in three-dimensional peptide scaffolds. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 136, p. 1–6, 2018.

BINGLE, L. et al. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 1, p. 101–107, 2006.

BOGORODSKAYA, D.; MCLANE, J. S.; LIGON, L. A. Dual-matrix 3D culture system as a biomimetic model of epithelial tissues. **bioRxiv**, n. Ravi 2015, p. 594-549, 2019.

BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124–131, 2015.

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

BROWN, J. H. et al. Nanofibrous PLGA electrospun scaffolds modified with type I collagen influence hepatocyte function and support viability in vitro. **Acta Biomaterialia**, v. 73, p. 217–227, 2018.

BRUN, P. et al. 3D Synthetic Peptide-based Architectures for the Engineering of the Enteric Nervous System. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

BUSHKALOVA, R. et al. Alginate-chitosan PEC scaffolds: A useful tool for soft tissues cell therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 118692, 2019.

CAMPODONI, E. et al. Polymeric 3D scaffolds for tissue regeneration: Evaluation of biopolymer nanocomposite reinforced with cellulose nanofibrils. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, n. October 2018, p. 867–878, 2019.

CAMPOS, G. et al. In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmacoresistant epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 146, n. June, p. 63–86, 2018.

CAROLINE, C. et al. Elaboration and evaluation of alginate foam scaffolds for soft tissue engineering. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, n. 1–2, p. 433–442, 2017.

CARTERSON, A. J. et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: Alternative tissue culture model for Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1129–1140, 2005.

CHEN, H. C.; HU, Y. C. Bioreactors for tissue engineering. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 18, p. 1415–1423, 2006.

CHEN, P. et al. The application of BMP-12-overexpressing mesenchymal stem cells loaded 3D-printed PLGA scaffolds in rabbit rotator cuff repair. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 79–88, 2019.

CHEN, Y. X. et al. Three-dimensional Culture of Human Airway Epithelium in Matrigel for Evaluation of Human Rhinovirus C and Bocavirus Infections. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 31, n. 2, p. 136–145, 2018.

CHOI, D. J. et al. Bioactive fish collagen/polycaprolactone composite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for 3D cell culture. **Journal of Biotechnology**, v. 205, p. 47–58, 2015.

CHOWANADISAI, W. et al. Cisplatin Resistant Spheroids Model Clinically Relevant Survival Mechanisms in Ovarian Tumors. **PloS one**, v. 11, n. 3, 2016.

COSTA, E. C. et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1427–1441, 2016.

CUADROS, T. R.; ERICES, A. A.; AGUILERA, J. M. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 46, p. 331–342, 2015.

ČUPERLOVIĆ-CULF, M. et al. Cell culture metabolomics: Applications and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 15–16, p. 610–621, 2010.

DHAMECHA, D. et al. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, n. August, p. 118627, 2019.

DRAHANSKY, M. et al. We are IntechOpen , the world 's leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, p. 13, 2016.

EDMONDSON, R. et al. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 2014.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193–236, 2002.

EKERT, J. E. et al. Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro - Implication for drug development. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2014.

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 59–74, 2011.

ESTRADA, M. F. et al. Modelling the tumour microenvironment in long-term microencapsulated 3D co-cultures recapitulates phenotypic features of disease progression. **Biomaterials**, v. 78, p. 50–61, 2016.

FEKI, A. et al. Dissemination of intraperitoneal ovarian cancer: Discussion of mechanisms and demonstration of lymphatic spreading in ovarian cancer model. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 72, n. 1, p. 1–9, 2009.

FELFEL, R. M. et al. Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 204, n. May 2018, p. 59–67, 2019.

FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. Bioinstructive microparticles for selfassembly of mesenchymal stem Cell-3D tumor spheroids. **Biomaterials**, v. 185, n. September, p. 155–173, 2018.

FONG, A.; DURKIN, A.; LEE, H. The potential of combining tubulin-targeting anticancer therapeutics and immune therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.

GARDNER, J. K.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Three-dimensional rotating wall vessel-derived cell culture models for studying virus-host interactions. **Viruses**, v. 8, n. 11, 2016.

GELAIN, F.; HORII, A.; ZHANG, S. Designer self-assembling peptide scaffolds for 3-D tissue cell cultures and regenerative medicine. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 5, p. 544–551, 2007.

GIANNAKOUROS, P. et al. MUC16 mucin (CA125) regulates the formation of multicellular aggregates by altering β -catenin signaling. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 1, p. 219–230, 2015.

GLICKLIS, R.; MERCHUK, J. C.; COHEN, S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 6, p. 672–680, 2004.

GONG, L. et al. Fibronectin regulates the dynamic formation of ovarian cancer multicellular aggregates and the expression of integrin receptors. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 9, p. 2493–2498, 2018.

GONG, Q. et al. The effects of calcipotriol on the dendritic morphology of human melanocytes under oxidative stress and a possible mechanism: Is it a mitochondrial protector? **Journal of Dermatological Science**, v. 77, n. 2, p. 117–124, 2015.

GORDON, J.; AMINI, S.; WHITE, M. K. General Overview of Neuronal Cell Culture. **Methods in Molecular Biology,** v. 1078, p. 1–6, 2013.

GUO, Y. et al. Platelets promote invasion and induce epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells by TGF- β signaling pathway. **Gynecologic Oncology**, v. 153, n. 3, p. 639–650, 2019.

GUPTA, N. et al. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 63–81, 2016.

HARRISON R.G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proceedings** of the Society for Experimental Biology and Medicine New York, v. 4, p. 140-143. 1907.

HARTUNG, T. 3D - A new dimension of in vitro research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 6, 2014.

HEMATIAN, A. et al. Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 7, n. 2, p. 77–82, 2016.

HEO, D. N.; HOSPODIUK, M.; OZBOLAT, I. T. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 95, p. 348–356, 2019.

HEREDIA-SOTO, V. et al. High-throughput 3-dimensional culture of epithelial ovarian cancer cells as preclinical model of disease. **Oncotarget,** v. 9, n. 31, p. 21893–21903, 2018.

HIRST, J. et al. Licofelone enhances the efficacy of paclitaxel in ovarian cancer by reversing drug resistance and tumor stem-like properties. **Cancer Research**, v. 78, n. 15, p. 4370–4385, 2018.

HOLEN, I. et al. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions . **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 4, p. 359–371, 2017.

HOWES, A. L. et al. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-Throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated Cytotoxicity compared to monolayer culture systems. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

HUANG, B.; GAO, J. Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor- targeted drug delivery system research. **Journal Control Release**, v. 270, n. December 2017, p. 246–259, 2018.

INTINI, C. et al. 3D-printed chitosan-based scaffolds: An in vitro study of human skin cell growth and an in-vivo wound healing evaluation in experimental diabetes in rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, n. July, p. 593–602, 2018.

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**, v. 147, p. 297–312, 2018.

JIANG, P. et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. **Nature Medicine**, v. 24, n. 10, p. 1550–1558, 2018.

JONG, B. K. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5 SPEC. ISS., p. 365–377, 2005.

JUSTICE, B. A.; BADR, N. A.; FELDER, R. A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1–2, p. 102–107, 2009.

KAMPAN, N. C. et al. Paclitaxel and its evolving role in the management of ovarian cancer. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

KELM, J. M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 2, p. 173–180, 2003.

KENNETH, P.C.; CASTAN, A.; LINDSKOG, E.K. Upstream Processing Equipament. **Biopharmaceutical Processing**, p. 457-476, 2018.

KENNY, H. A.; LENGYEL, E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. **Cell Cycle**, v. 8, n. 5, p. 683–688, 2010.

KENNY, P. A. et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular Oncology**, v. 1, n. 1, p. 84–96, 2007.

KHOT, M. I. et al. Inhibiting ABCG2 could potentially enhance the efficacy of hypericin-mediated photodynamic therapy in spheroidal cell models of colorectal cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, n. February, p. 221–229, 2018.

KIM, E. M. et al. Fabrication of core-shell spheroids as building blocks for engineering 3D complex vascularized tissue. **Acta Biomaterialia**, 2019a.

KIM, H. et al. Mesenchymal stem cell 3D encapsulation technologies for biomimetic microenvironment in tissue regeneration. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2019b.

KIM, S. A.; LEE, E. K.; KUH, H. J. Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial-mesenchymal transition in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 335, n. 2, p. 187–196, 2015.

KINNEY, M. A.; SARGENT, C. Y.; MCDEVITT, T. C. The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 17, n. 4, p. 249–262, 2011.

KIPP, A. P. et al. Time- and cell-resolved dynamics of redox-sensitive Nrf2, HIF and NF-κB activities in 3D spheroids enriched for cancer stem cells. **Redox Biology**, v. 12, n. March, p. 403–409, 2017.

KOBAYASHI, M. et al. Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2014.

KÜHBECK, D. et al. Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ioncrosslinked alginates. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 2306–2315, 2015. KUMAR, A.; STARLY, B. Large scale industrialized cell expansion: Producing the critical raw material for biofabrication processes. **Biofabrication**, v. 7, n. 4, 2015.

KUMAR, H. R. et al. Three-dimensional neuroblastoma cell culture: Proteomic analysis between monolayer and multicellular tumor spheroids. **Pediatric Surgery International**, v. 24, n. 11, p. 1229–1234, 2008.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, p. 1–14, 2018.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 782–791, 2017.

LAZZARI, G. et al. Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. **Acta Biomaterialia**, v. 78, p. 296–307, 2018.

LEE, J. H. et al. Microfluidic co-culture of pancreatic tumor spheroids with stellate cells as a novel 3D model for investigation of stroma-mediated cell motility and drug resistance. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–12, 2018a.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEE, S. W. L. et al. Characterizing the role of monocytes in T cell cancer immunotherapy using a 3d microfluidic model. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018b.

LEMKE, K. et al. A modular segmented-flow platform for 3D cell cultivation. **Journal** of Biotechnology, v. 205, p. 59–69, 2015.

LI, L. et al. Effects of concentration variation on the physical properties of alginatebased substrates and cell behavior in culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 184–195, 2019a.

LI, X. et al. Celastrol strongly inhibits proliferation, migration and cancer stem cell properties through suppression of Pin1 in ovarian cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 842, n. May 2018, p. 146–156, 2019b.

LIU, C.-Y. et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, 2015.

LIU, H. et al. A microfluidic strategy to fabricate ultra-thin polyelectrolyte hollow microfibers as 3D cellular carriers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, n. April, p. 109705, 2019.

LIVAK, KENNETH J. AND SCHMITTGEN, T. D. Anlaysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitativa PCR and the $2-\Delta\Delta C$ Method. **Methods**, p. 402–408, 2019.

LOESSNER, D. et al. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 32, p. 8494–8506, 2010.

LOH, Q. L.; CHOONG, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 19, n. 6, p. 485–502, 2013.

LUKYANOVA, L. et al. Preparation and evaluation of microporous organogel scaffolds for cell viability and proliferation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 105–112, 2010.

LUO, Z. et al. Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis? **Cancer Letters**, v. 377, n. 2, p. 174–182, 2016.

MADDEN, J. C. et al. Strategies for the optimisation of in vivo experiments in accordance with the 3Rs philosophy. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 140–154, 2012.

MALLEN, A. R.; TOWNSEND, M. K.; TWOROGER, S. S. Risk Factors for Ovarian Carcinoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 32, n. 6, p. 891–902, 2018.

MALTMAN, D. J.; PRZYBORSKI, S. A. Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 4, p. 1072–1075, 2010.

MARIN, T. M. et al. Acetaminophen absorption and metabolism in an intestine/liver

microphysiological system. **Chemico-Biological Interactions**, v. 299, n. November 2018, p. 59–76, 2019.

MARRERO, B.; MESSINA, J. L.; HELLER, R. Generation of a tumor spheroid in a microgravity environment as a 3D model of melanoma. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 45, n. 9, p. 523–534, 2009.

MARTINOVICH, K. M. et al. Conditionally reprogrammed primary airway epithelial cells maintain morphology, lineage and disease specific functional characteristics. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

MÁRTON, É. et al. Circulating epithelial-mesenchymal transition-associated miRNAs are promising biomarkers in ovarian cancer. **Journal of Biotechnology**, v. 297, n. April, p. 58–65, 2019.

MASOUD, G. N.; LI, W. HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 5, n. 5, p. 378–89, 2015.

MCGRAIL, D. J.; KIEU, Q. M. N.; DAWSON, M. R. The malignancy of metastatic ovarian cancer cells is increased on soft matrices through a mechanosensitive Rho-ROCK pathway. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 12, p. 2621–2626, 2014.

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

METZGER, W. et al. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. **Cytotherapy**, v. 13, n. 8, p. 1000–1012, 2011.

MUKUNDAN, S. et al. Nanofibrous composite scaffolds of poly(ester amides) with tunable physicochemical and degradation properties. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 21–35, 2015.

MURARKA, M. et al. Testing ovarian cancer cell lines to train dogs to detect ovarian cancer from blood plasma: A pilot study. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 32, p. 42–48, 2019.

MURPHY, A. R. et al. Scaffolds for 3D in vitro culture of neural lineage cells. **Acta Biomaterialia**, v. 54, p. 1–20, 2017.

MUSAELYAN, A. et al. Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 9, p. 926–934, 2018.

NAGELKERKE, A. et al. Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: How to go three-dimensional. **Analytical Biochemistry**, v. 437, n. 1, p. 17–19, 2013.

NAM, E. J. et al. MicroRNA profiling of a CD133+ spheroid-forming subpopulation of the OVCAR3 human ovarian cancer cell line. **BMC Medical Genomics**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 163, p. 94–108, 2016.

NING, Y. et al. Co-culture of ovarian cancer stem-like cells with macrophages induced SKOV3 cells stemness via IL-8/STAT3 signaling. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. April, p. 262–271, 2018.

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Author 's personal copy Progress in Polymer Science Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. v. 38, p. 1487–1503, 2013.

ONG, C. S. et al. In vivo therapeutic applications of cell spheroids. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 494–505, 2018.

ORAIOPOULOU, M. E. et al. A 3D tumor spheroid model for the T98G Glioblastoma cell line phenotypic characterization. **Tissue and Cell**, v. 59, n. November 2018, p. 39–43, 2019.

PARIDAH, M. . et al. 2D and 3D cell culture in drug discovery. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.

PARK, M. J. et al. Predicted drug-induced bradycardia related cardio toxicity using a zebrafish in vivo model is highly correlated with results from in vitro tests. **Toxicology Letters**, v. 216, n. 1, p. 9–15, 2013.

PRESCOTT, M. J.; LANGERMANS, J. A.; RAGAN, I. Applying the 3Rs to non-human primate research: Barriers and solutions. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 23, p. 51–56, 2017.

RAGHAVAN, S. et al. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. **Gynecologic Oncology**, v. 138, n. 1, p. 181–189, 2015.

REBELO, S. P. et al. 3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment. **Biomaterials**, v. 163, p. 185–197, 2018.

REID, B. M.; PERMUTH, J. B.; SELLERS, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer Biology and Medicine**, v. 14, n. 1, p. 9–32, 2017.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Serial Cultivation of strains of human epidermal keratinocytes- formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, v. 6, p. 331–344, 1975.

RIMANN, M. et al. An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. **Journal of Biotechnology**, v. 189, p. 129–135, 2014.

RIMANN, M.; GRAF-HAUSNER, U. Synthetic 3D multicellular systems for drug development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 803–809, 2012.

ROBINSON-BENNETT, B.; HAN, A. 30 Role of Immunohistochemistry in Elucidating Lung Cancer Metastatic to the Ovary from Primary Ovarian Carcinoma. **Elsevier Inc.**, v. 4, 2005.

RODRIGUES, T. et al. Emerging tumor spheroids technologies for 3D in vitro cancer modeling. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 184, n. October 2017, p. 201–211, 2018.

ROLFE, M. D. et al. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, 2012.

ROOSENS, A.; PUYPE, I.; CORNELISSEN, R. Scaffold-free high throughput generation of quiescent valvular microtissues. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 106, p. 45–54, 2017.

ROSELLINI, A. et al. Enhanced in vitro virus expression using 3-dimensional cell culture spheroids for infection. **Journal of Virological Methods**, v. 265, n. August 2018, p. 99–104, 2019.

ROSSER, J. et al. Microfluidic nutrient gradient-based three-dimensional chondrocyte culture-on-a-chip as an in vitro equine arthritis model. **Materials Today Bio**, v. 4, n. April, p. 100023, 2019.

SABERIANPOUR, S. et al. Encapsulation of rat cardiomyoblasts with alginate-gelatin microspheres preserves stemness feature in vitro. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. August 2018, p. 402–407, 2019.

SAMBALE, F. et al. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. **Journal of Biotechnology**, v. 205, p. 120–129, 2015.

SANT, S.; JOHNSTON, P. A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 27–36, 2017.

SANTBERGEN, M. J. C. et al. Online and in situ analysis of organs-on-a-chip. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 115, p. 138–146, 2019.

SANTO, V. E. et al. Adaptable stirred-tank culture strategies for large scale production of multicellular spheroid-based tumor cell models. **Journal of Biotechnology**, v. 221, p. 118–129, 2016.

SARISOZEN, C.; ABOUZEID, A. H.; TORCHILIN, V. P. The effect of co-delivery of paclitaxel and curcumin by transferrin-targeted PEG-PE-based mixed micelles on resistant ovarian cancer in 3-D spheroids and in vivo tumors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 539–550, 2014.

SCOTT, C. W.; PETERS, M. F.; DRAGAN, Y. P. Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. **Toxicology Letters**, v. 219, n. 1, p. 49–58, 2013.

SHERMAN, B. H.; EGLEN, R. M.; BERGERON, A. High-Throughput Spheroid Culture - Applications of 3D Cell Culture. **Drug discovery World: turnig Science into Businnes**, p. 1–11, 2019.

SIDHU, K. et al. Alginate microcapsule as a 3D platform for propagation and differentiation of human embryonic stem cells (hESC) to different lineages. **Journal** of visualized experiments : JoVE, n. 61, p. 7–10, 2012.

SODEK, K. L.; RINGUETTE, M. J.; BROWN, T. J. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive

phenotype. International Journal of Cancer, v. 124, n. 9, p. 2060–2070, 2009.

SONODA, T. et al. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. **Cancer Letters**, v. 196, n. 2, p. 229–237, 2003.

STEVENSON, R. P.; VELTMAN, D.; MACHESKY, L. M. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 5, p. 1073–1079, 2012.

STEWART, C.; RALYEA, C.; LOCKWOOD, S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 2, p. 151–156, 2019.

SUH, D. H. et al. Metabolic orchestration between cancer cells and tumor microenvironment as a co-evolutionary source of chemoresistance in ovarian cancer: A therapeutic implication. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 43–54, 2014.

SUTHERLAND, R. M. et al. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. **International Journal of Radiation Biology**, v. 18, n. 5, p. 491–495, 1970.

SVIRSHCHEVSKAYA, E. et al. Characteristics of multicellular tumor spheroids formed by pancreatic cells expressing different adhesion molecules. **Life Sciences**, v. 219, n. October 2018, p. 343–352, 2019.

SWIOKLO, S. et al. Process parameters for the high-scale production of alginateencapsulated stem cells for storage and distribution throughout the cell therapy supply chain. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 289–296, 2017.

TANENBAUM, L. M. et al. Ovarian cancer spheroid shrinkage following continuous exposure to cisplatin is a function of spheroid diameter. **Gynecologic Oncology**, v. 146, n. 1, p. 161–169, 2017.

THOMA, C. R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 29–41, 2014.

THUWAJIT, C. et al. The metabolic cross-talk between epithelial cancer cells and stromal fibroblasts in ovarian cancer progression: Autophagy plays a role. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1235–1254, 2018.

TIAN, C. et al. Recent advances in microfluidic technologies for organ-on-a-chip. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 117, p. 146–156, 2019.

TÜRKER, E.; YILDIZ, Ü. H.; ARSLAN YILDIZ, A. Biomimetic hybrid scaffold consisting of co-electrospun collagen and PLLCL for 3D cell culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1054–1062, 2019.

TURNBULL, G. et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278–314, 2018.

VADIVELU, R. K. et al. Generation of three-dimensional multiple spheroid model of olfactory ensheathing cells using floating liquid marbles. **Scientific Reports**, v. 5, n. June, p. 1–12, 2015.

WANG, W.; LIU, J. R.; ZOU, W. Immunotherapy in Ovarian Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 447–464, 2019.

WANG, Y. et al. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. **Current Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 9, p. 963–972, 2013.

WARE, M. J. et al. Generation of homogenous three-dimensional pancreatic cancer cell spheroids using an improved hanging drop technique. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 22, n. 4, p. 312–321, 2016.

WASUNGU, L. et al. A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, n. 2, p. 278–284, 2009.

WILSON, J. et al. Algiante Encapsulation Parameters Infuence the Differentation of Microencapsulated Embryonic Stem Cells Agregates. **Biotechnology Bioengineering.** v. 111, n. 3, p. 618–631, 2014.

XIN, X. et al. 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. **Process Biochemistry**, v. 78, n. September 2018, p. 148–160, 2019.

XU, K. et al. 3D porous chitosan-alginate scaffold stiffness promotes differential responses in prostate cancer cell lines. **Biomaterials**, v. 217, n. April, 2019.

YIN, Y. B. et al. Mini-gut: a promising model for drug development. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, p. 1–11, 2019.

YOKOBORI, K. et al. Intracellular localization of pregnane X receptor in HepG2 cells cultured by the hanging drop method. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 32, n. 5, p. 265–272, 2017.

YU, F.; CHOUDHURY, D. Microfluidic bioprinting for organ-on-a-chip models. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 6, p. 1248–1257, 2019.

ZHAI, J. et al. Cell-based drug screening on microfluidics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2019.

ZHANG, S. et al. The effects of spheroid formation of adipose-derived stem cells in a microgravity bioreactor on stemness properties and therapeutic potential. **Biomaterials**, v. 41, p. 15–25, 2015.

ZHANG, S.; GELAIN, F.; ZHAO, X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5 SPEC. ISS., p. 413–420, 2005.

ZHANG, W. et al. Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. **Analytical Biochemistry**, v. 515, p. 47–54, 2016.

ZHANG, Z.; TANG, W. Drug metabolism in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 5, p. 721–732, 2018.

ZHENG, X.; LI, H. TKTL1 modulates the response of paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells to paclitaxel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 2, p. 572–579, 2018.