

ARTIGO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01047>

Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o *in vitro* do *in vivo*

Three-dimensional cell culture: nearing the gap between *in vitro* and *in vivo* models

Marianna Cavalheiro^{I,III}

Ana Paula D N de Barros^{II,III}

Rafaela de A Louback^{II,III}

Maria Isabel D Rossi^{II,III}

RESUMO

Introdução: Os avanços biotecnológicos em associação com a pressão para substituir a experimentação animal impulsionam o desenvolvimento de modelos *in vitro* mais fisiológicos e preditivos da resposta *in vivo*. **Objetivo:** Discutir vantagens e limitações de modelos tridimensionais (3D) de cultura de células. **Método:** Revisão da literatura na base PubMed utilizando os termos “3D culture”, *spheroid*, *organoid*, “*organotypic culture*”, “*alternative model*”, *microfluidic*, *organ-on-a-chip* e *biotechnology*, individualmente e em diferentes combinações. A pesquisa abrangeu o período de 1971 a 2017. **Resultados:** Ensaios tradicionais de cultura em monocamada, embora sejam amplamente utilizados, não reproduzem as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, que criam gradientes físicos e químicos e controlam funções celulares, como sobrevivência, proliferação, diferenciação, migração e expressão de genes e proteínas. Modelos 3D de cultura de células são capazes de mimetizar um microambiente mais fisiológico. O número de publicações no período estudado reflete o crescente interesse científico no tema. **Conclusões:** Embora os modelos 3D tenham inequivocamente contribuído para as áreas de bioengenharia, morfogênese, oncologia e toxicologia, muitos desafios permanecem. O custo elevado de alguns destes modelos, reproduzir as características mecânicas, espaciais e temporais dos tecidos, assim como a necessidade de desenvolver protocolos padronizados devem ser considerados.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura 3D; Modelo Alternativo; Esferoide Multicelular; Cultura Organotípica; Organóide

ABSTRACT

Introduction: Biotechnological advances in association with the pressure to substitute animal experimentation impelled the development of *in vitro* models that are more physiological and predictive of *in vivo* response. **Objective:** To discuss advantages and limitations of three-dimensional (3D) cell culture models. **Method:** Review of the scientific literature at PubMed using the keywords “3D culture”, *spheroid*, *organoid*, “*organotypic culture*”, “*alternative model*”, *microfluidic*, *organ-on-a-chip* and *biotechnology*, individually and in different combinations. The search period was from 1971 to 2017. **Results:** Traditional monolayer cell culture assays, although extensively used, do not reproduce the cell-cell and cell-extracellular matrix interactions that create physical and chemical gradients and that control cell functions, such as survival, proliferation, differentiation, migration, and protein and gene expression. 3D cell culture models are able to mimic more physiological microenvironment. The number of manuscripts published in this period reflects the scientific interest in the field. **Conclusions:** Although 3D models have unequivocally contributed to the bioengineering, morphogenesis, oncology, and toxicology fields, many challenges remain. The high cost of some of these models, to reproduce the mechanical spatiotemporal features of the tissues, as well as the lack of standard protocols should be taken into account. Here we discuss the advantages and limitations of some 3D cell culture models.

KEYWORDS: 3D Culture; Alternative Model; Multicellular Spheroid; Organotypic Culture; Organoid

^I Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, RJ, Brasil

^{II} Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: idrossi@hucff.ufrj.br

Recebido: 30 set 2017
Aprovado: 23 jan 2018



INTRODUÇÃO

Desde a última década do século XX até hoje, o avanço tecnológico na área da biologia e da saúde foi imenso. Foram criadas ferramentas e metodologias que possibilitam a manipulação de moléculas de DNA e RNA e o desenvolvimento *in vitro* de tecidos e órgãos com características semelhantes às observadas *in vivo*. A capacidade de sequenciar o genoma de maneira rápida e eficiente foi grandemente ampliada desde 1995, ano da primeira publicação científica no tema, até 2001, quando os primeiros resultados do projeto genoma humano foram publicados^{1,2}. Concomitantemente, o conhecimento adquirido nas últimas décadas sobre células-tronco derivadas da camada interna de blastocistos (células-tronco embrionárias), de tecidos adultos e as de pluripotência induzida (iPSC - *induced Pluripotent Stem Cell*) tem trazido um avanço considerável na área da Medicina Regenerativa, que inclui a terapia celular e a bioengenharia^{3,4,5,6,7,8}, com 6.205 ensaios clínicos utilizando células-tronco registrados até o momento (Fonte: <https://clinicaltrials.gov>). Ou seja, a área de Biotecnologia, definida como “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica”, pelo art. 2º do texto aprovado na Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (Rio de Janeiro, 5 a 14 de junho de 1992) e aprovado pelo Decreto Legislativo nº 2 de 1994, tem se expandido continuamente. Sem dúvida, a biotecnologia abre enormes possibilidades, como criação de organismos sintéticos^{9,10} e mudança na forma de lidar com patologias causadas por mutações genéticas^{11,12}. No entanto, é inquestionável que seu provável avanço nos próximos anos cria desafios éticos e regulatórios, que já vem sendo debatidos em países desenvolvidos^{11,13,14}.

No Brasil, o debate avança de forma mais lenta para a aprovação de terapias celulares e comercialização de tecidos engenheirados a partir de células humanas. A polêmica da comercialização recai sobre § 4º do art. 199 da Constituição Federal que, apesar de aprovar a “remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas” incluindo a “coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados”, restringe essas práticas a “fins de transplante, pesquisa e tratamento” vetando “todo tipo de comercialização”¹⁵. A legislação brasileira vigente ainda possui dispositivos como a Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997 e a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 (Lei de Biossegurança), que dispõem, respectivamente, sobre a disposição gratuita de órgãos, tecidos ou partes do organismo e sobre a normativa de segurança e fiscalização das atividades que envolvam organismos geneticamente modificados (OGMs)^{16,17}. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) vem avançando, de forma discreta, no desenvolvimento de diretrizes mais significativas na área. É o caso da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) no 9, de 14 de março de 2011 que: “Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia”¹⁸. Esta questão, por requerer um fórum específico, embora urgente e necessária, não será abordada mais amplamente neste espaço.

Novos produtos biotecnológicos na área da saúde requerem plataformas ou modelos que permitam avaliar sua eficácia e segurança

antes de sua aplicação em testes clínicos. Em geral, os testes pré-clínicos envolvem modelos *in vitro* com cultura de células em monocamada, na sua maioria de linhagens celulares imortalizadas e comercialmente disponíveis, e modelos *in vivo*. Os testes *in vivo*, que utilizam animais de laboratório, são frequentemente inadequados em função de diferenças espécie-específicas. Além disso, como consequência da preocupação quanto à utilização de animais como modelo experimental, a política de substituição, redução e refinamento, denominada de política dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*), foi introduzida na década de 1950. No Reino Unido, o *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs - www.nc3rs.org.uk) foi criado tendo como missão encontrar soluções inovadoras para atingir os objetivos da política dos 3Rs, o que também impulsionou o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais^{19,20}. O próprio avanço biotecnológico é propulsor do desenvolvimento de modelos alternativos reprodutíveis, mais próximos da biologia humana e, consequentemente, com maior poder preditivo.

Objetivou-se apresentar diversos tipos de modelos de cultivo tridimensional numa perspectiva histórica e discutir criticamente vantagens e limitações destes quanto ao seu poder preditivo e reprodutibilidade para implantação como alternativa ao uso de animais de experimentação. Em função da vasta literatura, não se pretendeu esgotar o assunto e, assim, informação complementar foi indicada.

MÉTODO

Aqui apresentamos uma revisão narrativa da literatura sobre modelos de cultura tridimensional, sem esgotar o tema, dada a vastidão de artigos no assunto, o que reflete o grande interesse científico atual na área. O levantamento da literatura foi realizado através de consulta a base de dados PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), utilizando as expressões: “3D culture”, *spheroid*, *organoid*, “*organotypic culture*”, “*alternative model*”, *microfluidic*, *organ-on-a-chip* e *biotechnology*, individualmente e em diferentes combinações, tais como: (a) “3D culture” OR *spheroid*; (b) “3D culture” AND “*alternative model*” e (c) “3D culture” AND *biotechnology*. A pesquisa abrangeu o período de 1971 a 2017 e os artigos foram selecionados por sua importância histórica e científica, levando-se em consideração, ainda, sua disponibilidade no portal Capes (www.periodicos.capes.gov.br) ou livre acesso. Dado o número de publicações no assunto (total de 5.497 no período determinado, utilizando apenas as palavras-chave *spheroid* ou “3D culture”), foram selecionados artigos de revisão como fonte de consulta complementar. Informações complementares sobre biotecnologia foram obtidas na página do governo brasileiro com acervo de leis federais e a Constituição de 1988 (<http://www4.planalto.gov.br/legislacao>). Além disto, a página do NC3Rs (www.nc3rs.org.uk) foi consultada sobre a política de redução, substituição e refinamento do uso de animais em experimentação.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelos de cultura de células animais bidimensionais e tridimensionais: histórico

Culturas de células animais foram introduzidas no início do século XX como método de estudo e, após o isolamento da primeira linhagem de células tumorais humanas, as células HeLa, na década de 1950, foram crescentemente utilizadas^{21,22}. Embora esta técnica tenha permitido inegáveis avanços na área de biologia celular e ainda seja amplamente utilizada, a partir do final do século XX e início do XXI, as limitações do modelo, em especial no que diz respeito a testes de novos fármacos, se tornaram evidentes. Numa cultura tradicional, em geral denominada de cultura bidimensional (2D), as células tendem a formar uma monocamada aderida a uma superfície de poliestireno modificado para favorecer a adesão, o que é obviamente um substrato não encontrado *in vivo* e que induz uma polarização artificial das células, não observada quando estas estão nos tecidos. *In vivo*, as células interagem entre si através de moléculas de adesão, principalmente da família das caderinas, e de complexos juncionais (desmossomos, junção íntima ou oclusiva e junção de adesão) que se ligam, na sua porção citoplasmática, a proteínas do citoesqueleto, através de moléculas adaptadoras^{23,24,25,26}. Além disso, dependendo do tipo, as células se encontram: (a) imersas numa matriz extracelular de composição variada, que inclui diversos tipos de colágeno, fibras elásticas, diversas glicoproteínas, como fibronectina, laminina e vitronectina, além de proteoglicanos e glicosaminoglicanos ou (b) apoiadas numa lâmina basal formada predominantemente por laminina, além de colágeno IV e proteoglicanos. As células ligam-se à matriz extracelular via moléculas principalmente do tipo integrina, que também interagem, através de moléculas adaptadoras, ao citoesqueleto^{27,28,29}. Estas interações célula-célula e célula-matriz extracelular criam forças mecânicas que organizam espacialmente tanto a matriz extracelular quanto os componentes celulares (citoesqueleto e organelas), modulando diversas propriedades celulares, como forma, diferenciação e migração^{26,30,31,32,33,34,35,36}. Associadas a gradientes químicos gerados por difusão de fluidos, O₂ e metabólitos celulares^{37,38,39,40}, e pela associação de fatores de crescimento e quimiocinas a moléculas da matriz extracelular^{27,41} estas interações formam microambientes específicos, ou nichos, que regulam a homeostasia dos tecidos^{42,43,44,45}. Tanto as interações celulares complexas quanto os gradientes físicos e químicos observados nos tecidos não são reproduzidos nas culturas em monocamada sobre plástico^{33,40,46,47,48,49,50,51,52,53,54}. Além disso, possivelmente como resultado de sua adaptação às condições de cultura em monocamada, as células modificam o padrão de expressão gênica^{49,51,54,55,56}. Portanto, não é surpreendente que, dependendo dos objetivos do estudo, os resultados observados com estes modelos *in vitro* muito frequentemente não sejam reproduzidos *in vivo*. De fato, os resultados instigantes do grupo da Dra. Mina Bissell^{57,58}, obtidos a partir de cultivo de células em sistema tridimensional (3D), mudaram o panorama na área de oncologia, merecendo um editorial na revista *Nature* intitulado “Goodbye flat biology?”⁵⁹ e o lançamento, pelo Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos (NIC - *National Cancer Institute*), de um programa de pesquisa, iniciado em outubro de 2003, com

orçamento anual de US\$ 400 milhões para modelos de cultura 3D⁶⁰. Isto impulsionou o desenvolvimento de sistemas *in vitro* que buscam mimetizar a fisiologia e a histologia de órgãos e tecidos humanos, o que é refletido pelo aumento no número de publicações científicas sobre o assunto desde então⁵¹. Um levantamento no portal PubMed, utilizando os termos “3D culture” OR *spheroid* resultou em 5.497 artigos publicados no período de 1971 a 2017. A análise ao longo do tempo indicou um grande aumento no número de artigos publicados a partir do início do século XX. De 1971 até 2000, a média foi de 37 artigos ao ano, passando para 261 artigos ao ano a partir de 2001. Somente em 2017 foram publicados 936 artigos, o que comprova o interesse no assunto e o impacto dos resultados obtidos com modelos *in vitro* tridimensionais.

Tipos de modelos de cultivo 3D

Diversos sistemas de cultura, que propõem uma abordagem onde uma organização mais fisiológica, complexa e tridimensional das células ocorra, têm sido desenvolvidos, desde os primeiros relatos em 1971. Técnicas, denominadas de cultura 3D, culturas organotípicas ou culturas de organoides, incluem sistemas onde as células são cultivadas em moldes tridimensionais de composição variável, modelos em que células ou fragmentos de órgãos são mecanicamente sustentados (Figura 1) e modelos de agregados em suspensão, denominados esferoides por seu aspecto arredondado (Figura 2). Mais recentemente, sistemas microfabricados de cultura microfluidica (*microfluidics culture*) e os denominados de órgãos sobre chip (*organ-on-a-chip*) foram introduzidos.

Cultivo em moldes de biopolímeros, cerâmica ou metal

Os modelos que utilizam moldes procuram criar um ambiente que mimetize a matriz extracelular e, conseqüentemente, regule a organização espacial das células, sua migração, proliferação e diferenciação. Uma grande diversidade de substâncias, como moléculas de matriz extracelular, biopolímeros naturais, polímeros sintéticos ou híbridos, cerâmicas e metais, tem sido utilizada como molde^{49,51,53,61,62,63,64}. Os diversos biomateriais variam na sua rigidez, porosidade e potencial biodegradável e a escolha do material depende tanto do tipo celular, quanto da aplicação do estudo. Fatores de crescimento podem ser incorporados, favorecendo a proliferação e a diferenciação das células cultivadas nestes moldes e tornando-os mais fisiológicos, ou seja, mais similares à matriz extracelular dos tecidos. A variedade de biomateriais e suas aplicações são objetos de revisões específicas^{49,51,53,63,64}.

Os sistemas com matriz extracelular ou biopolímeros foram inicialmente propostos com o cultivo de células primárias (obtidas por dissociação de tecidos *ex vivo*) ou linhagem estabelecida, em suspensão ou como agregados, sobre substrato de matriz extracelular, o que não constitui propriamente uma cultura 3D (Figura 1A). Ainda assim, verificou-se que este tipo de cultura favoreceu a proliferação e a diferenciação das células, permitindo que estas se associassem de forma mais fisiológica, mimetizando sua organização *in vivo*. Estes estudos contribuíram para o entendimento do impacto das interações célula-matriz extracelular nas propriedades celulares e como estas eram modificadas dependendo do tipo de substrato^{49,63,64,65,66,68}.



Na tentativa de reconstituir um ambiente mais fisiológico, as células foram encapsuladas na matriz polimerizada, que forma um gel (Figura 1B). Neste ambiente tridimensional, em contato com moléculas da matriz extracelular, diferentes tipos celulares (tumoriais e fibroblastos, entre outras) foram capazes de migrar de forma muito semelhante ao observado *in vivo*, o que possibilitou investigar os detalhes da interação célula-matriz durante a migração^{69,70}. Além disso, estes modelos permitem que as células se organizem de forma complexa. Por exemplo, células derivadas de glândulas mamárias formam estruturas semelhantes a dutos ramificados ou a ácinos^{71,72} (Figura 1C-D). Ou seja, num ambiente 3D, as células organizam-se espontaneamente formando estruturas histológicas complexas, que se assemelham às observadas nos órgãos dos quais derivam. Por este motivo, estas estruturas foram denominadas de organoides (*oides*, do latim, significa semelhante). No entanto, alguns grupos de cientistas restringem o termo organoide a modelos 3D iniciados com células-tronco ou progenitores, que proliferam e se diferenciam, gerando uma progênie que forma estruturas histológicas semelhante à dos órgãos de origem^{63,73,74}. Organoides de intestino (*mini-guts*) foram descritos em 2009 a partir de células com potencial de célula-tronco, isoladas das criptas do intestino delgado, que foram cultivadas em modelo 3D de matrigel. O sistema permitiu a proliferação e a diferenciação destas células que originaram as demais populações do epitélio intestinal (enterócitos, células caliciformes e células de Paneth) e formaram estruturas semelhantes às criptas e vilosidades intestinais^{75,76}. Ou seja, o modelo foi capaz de revelar o potencial de diferenciação das células-alvo, confirmando sua identidade como célula-tronco intestinal. Organoides de cérebro

(*mini-brains*) foram desenvolvidos a partir de uma adaptação do modelo de indução de neuroectoderma em corpos embrionários formados por células-tronco embrionárias⁷⁷. Além de possibilitar a compreensão da morfogênese do tecido nervoso, estes organoides mostraram-se uma ferramenta importante na descrição de mecanismo patológico do vírus Zika e sua possível implicação no desenvolvimento de microcefalia⁷⁸. Os exemplos acima mostram as potenciais aplicações deste sistema de cultura na compreensão da morfogênese dos tecidos e na modelagem de doenças e, portanto, não é de se estranhar que uma lista crescente de outros modelos, como de fígado, retina, pituitária, pulmão, pode ser encontrada na literatura científica^{63,73,74,79}.

Modelos de cultura 3D mecanicamente sustentados

Culturas de órgãos e fragmentos de tecido foram introduzidas em meados do século XX e, como as condições de difusão de nutrientes e trocas gasosas não são ideais se os tecidos ficam imersos em meio líquido, as estratégias de cultura foram orientadas no sentido de favorecer estes processos. Assim, as culturas de órgãos utilizam um suporte que permite que os tecidos fiquem numa interface líquido-ar (Figura 1E). Inicialmente, os suportes foram montados com filtro microporoso aplicado sobre grade de metal, gel de colágeno ou esponja, mas, recentemente, insertos com membrana porosa, disponíveis comercialmente, são os suportes mais utilizados^{21,63,80,81}. Este tipo de cultura mantém as características histológicas dos tecidos e trouxe avanços em várias áreas do conhecimento. Entre os vários tipos de cultura de órgãos, o modelo de cultura de timo fetal (FTOC, *fetal thymus*

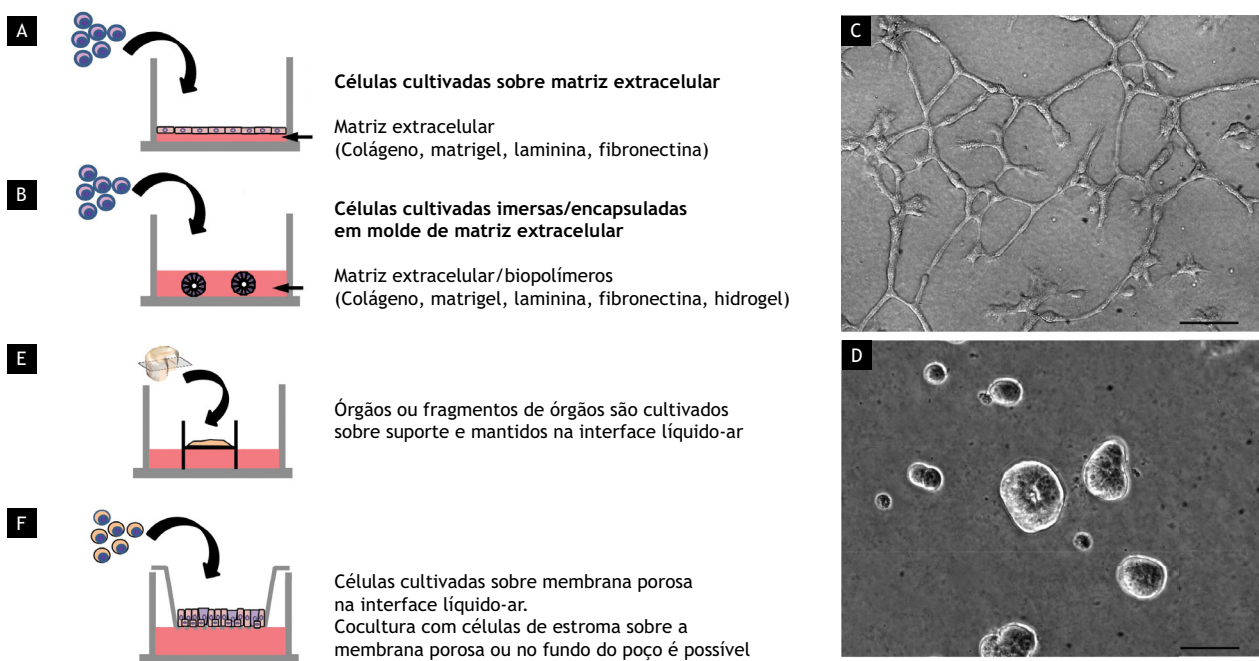


Figura 1. Modelos de cultura de células e culturas organotípicas. (A) Modelo de cultura sobre biopolímero. As células são distribuídas em frascos de cultura cuja superfície foi recoberta com moléculas de matriz extracelular, como colágeno I e matrigel. (B) Modelo de cultura em molde de biopolímero natural ou sintético. As células são encapsuladas em gel de biopolímero, o que permite sua organização tridimensional mais fisiológica (C-D). Linhagens humanas de tumor de mama basal MDA-MB-231 (C) e luminal T-47D (D) foram encapsuladas em matrigel (cultivo 3D), formando, respectivamente, estruturas semelhantes a dutos ramificados (C) ou ácinos (D). Contraste de fase. Barras = 100 μ m (C) e 50 μ m (D). (E-F) Cultura sobre suporte mecânico. Órgãos ou fragmentos de órgãos (E) e células (F) são cultivados em inserto na interface líquido-ar.



organ culture) foi um dos mais amplamente utilizados, tendo contribuído de forma relevante na compreensão das etapas e mecanismos de diferenciação de linfócitos T^{80,81,82,83}.

Este tipo de modelo com suporte mecânico foi mais recentemente adaptado para cultura de células que tradicionalmente se encontram em contato com o ar *in vivo*, como queratinócitos e epitélio respiratório (Figura 1F). As células são cultivadas sobre membrana porosa de inserto e expostas à interface líquido-ar. A superfície da membrana pode ser coberta por matriz extracelular e, ainda, este modelo permite cocultura com fibroblastos, que, imersos na matriz de colágeno, mimetizam o estroma subjacente. Queratinócitos derivados da epiderme, quando cultivados em meio líquido, formam uma monocamada, mas, ao serem expostos a uma interface líquido-ar, estratificam e diferenciam-se formando uma camada queratinizada^{63,84}. De maneira similar, as células das vias aéreas condutoras cultivadas neste sistema se organizam de forma mais fisiológica, reproduzindo a morfologia do epitélio respiratório, ou seja, um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, onde células caliciformes podem ser observadas^{85,86,87,88}. O potencial destes sistemas de cultura, não só na compreensão de mecanismos de morfogênese e de propriedades biológicas dos epitélios, mas, sobretudo, como modelos alternativos para teste de novos fármacos e de citotoxicidade, é evidente. De fato, modelos de epiderme, como o Episkin (L'Oreal e Shanghai Episkin Biotechnology Ltd.), e de epitélio respiratório, como o EpiAirway™ (MatTek Corporation) e o MucilAir™ (Epithelix) estão comercialmente disponíveis atualmente.

Agregados celulares 3D: esferoide multicelular

O modelo de cultura 3D do tipo esferoide multicelular foi inicialmente desenvolvido como reagregados celulares para estudo de

biologia do desenvolvimento nas décadas de 1940-1950^{89,90,91}. A partir da década de 1970, Sutherland et al.⁹² impulsionaram as pesquisas na área de oncologia, ao propor o modelo para estudo sistemático da resposta dos tumores à radioterapia e a drogas^{89,90}. O modelo de esferoide multicelular baseia-se na capacidade de adesão homotípica célula-célula, quando sua adesão ao plástico dos frascos de cultura é impedida. De forma geral, os métodos (Figura 2A) como a técnica de cultura em gota pendente, o cultivo em superfícies não aderentes^{89,90,91,93,94} e, mais recentemente, o método de levitação magnética (MLM - *magnetic levitation method*), no qual as células são cultivadas com nanopartículas e mantidas em cultura com campo magnético⁹⁵, permitem a formação de agregados celulares arredondados (Figura 2B). O tamanho dos esferoides varia em função do número de células cultivadas e do tipo celular. Além disso, diferenças na capacidade de estabelecer adesões célula-célula influenciam a formação dos esferoides, que podem ser mais frouxos, com uma superfície irregular, ou mais firmes (Figura 2B)^{33,54,89,90}. O modelo permite o cocultivo de diferentes tipos celulares e é interessante que nestes esferoides as células se organizam espontaneamente, depositam matriz extracelular e formam microambientes específicos^{89,90,91,96,97}. Em função da difusão da periferia, em contato com o meio de cultura, para o centro do esferoide, um gradiente químico de O₂ e de nutrientes e metabólitos celulares se estabelece ao longo do raio do esferoide (Figura 2C). Essa difusão pode ser melhorada com o uso de biorreatores⁵³. Deve ser dito que diversos tipos de biorreatores estão hoje disponíveis, mas nem todos serão igualmente adequados.

A concentração de O₂ no centro do esferoide correlaciona-se inversamente com o tamanho do mesmo e, embora variações sejam observadas, em geral os esferoides de diâmetro acima de 500 µm

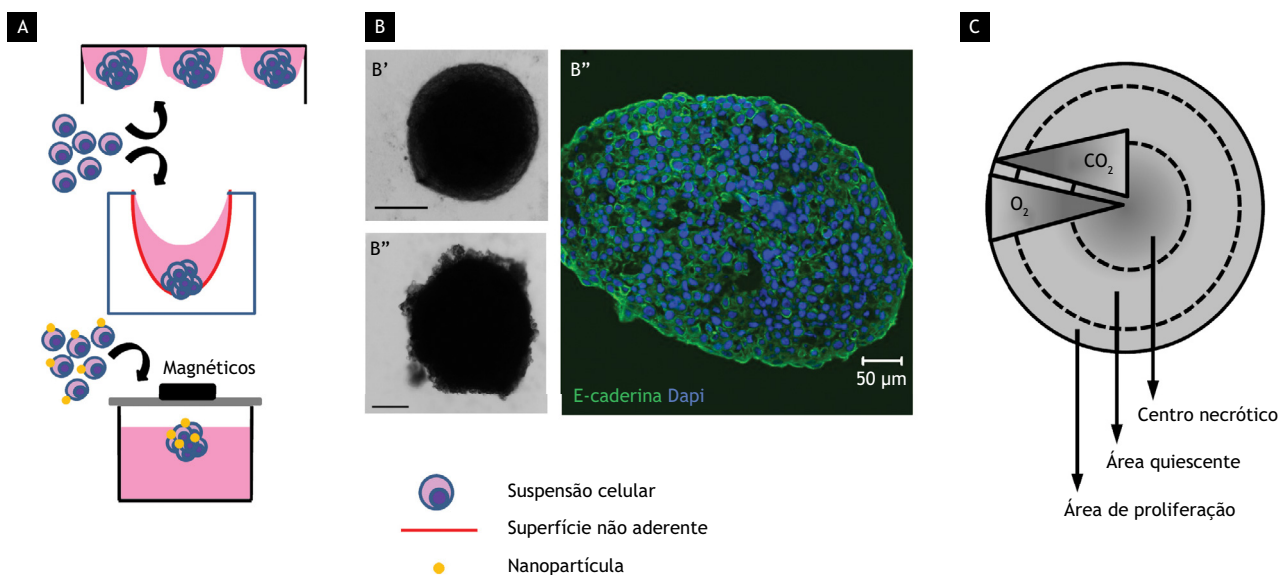


Figura 2. Modelo de cultura 3D do tipo esferoide multicelular. (A) Suspensão celular cultivada utilizando a técnica de gota pendente (acima), em frasco de cultura com superfície modificada para impedir a adesão (meio) e utilizando a técnica de levitação magnética, na qual as células são incubadas com nanopartícula e expostas a um campo magnético. (B) Morfologia dos esferoides de fibroblasto humano (B') e de linhagens humanas de tumor de mama luminal, MCF-7 (B'') e basal MDA-MB-231 (B'''). Notar a superfície irregular do esferoide de MDA-MB-231 quando comparado ao do de fibroblasto e a expressão da molécula de adesão E-caderina (em verde) nas células de MCF-7. Núcleos corados com DAPI (em azul). Contraste de fase (B' e B''') e microscopia confocal (B''). Barras = 50µm. (C) Esquema de esferoide mostrando gradiente de O₂ e CO₂ do centro para a periferia e as regiões de proliferação, quiescência e morte celular que podem ser observadas estão indicadas.



desenvolvem apoptose e necrose das células localizadas na região central em função da hipóxia. Esta zona central é circundada por uma região de células quiescentes e, mais externamente, pode-se formar uma zona de proliferação, presente nos esferoides de células tumorais, mas praticamente ausente naqueles formados por células não transformadas^{54,89,90,91,93,94,97,98,99,100,101,102}.

A hipóxia central e as diversas regiões formadas tornam o modelo especialmente vantajoso na área de oncologia por se assemelhar a nódulos tumorais não vascularizados^{54,103}. Por outro lado, o modelo também pode favorecer o estudo de mecanismos de angiogênese, quando coculturas com células endoteliais são estabelecidas^{101,104,105,106}. Digno de nota, a integração das células endoteliais no modelo de esferoide de cardiomiócitos murinos promoveu sobrevivência das células, sugerindo que houve melhora na difusão das moléculas presentes no meio de cultura¹⁰⁵. O modelo vem sendo utilizado, com discernimento e menor frequência em função do possível desenvolvimento de necrose central, na área de bioengenharia tecidual^{106,107,108}.

A semelhança dos esferoides com nódulos tumorais avascularizados impulsionou sua aplicação em testes com quimioterápicos e novos fármacos. Diversos ensaios mostraram que enquanto células tumorais em monocamada foram sensíveis à ação de diversos quimioterápicos, quando cultivadas em modelo de esferoide mostraram-se resistentes. Por outro lado, algumas drogas mostraram-se eficazes somente quando as células se encontravam em ambiente 3D^{54,103,109,110}. Como resultado dessas diferenças, ensaios de alto desempenho com modelo de esferoide para triagem de fármacos antitumorais (*high-throughput screening assay*) têm sido cada vez mais frequentes^{54,103,111,112,113,114,115}. Concomitantemente, novas ferramentas de análise têm sido desenvolvidas^{116,117,118}, o que reforça o potencial deste modelo na área de oncologia.

Modelos de cultura microfluídica e de órgãos em chip

A ausência de vasos sanguíneos na maioria dos modelos 3D tem impacto sobre o transporte de fluidos e pequenas moléculas^{119,120}. Com o objetivo de tornar mais fisiológico os modelos 3D de cultura de células, técnicas que possibilitam criar um controle espacial dos fluidos, denominadas de microfluídica (*Microfluidic techniques*), têm sido desenvolvidas. O controle do fluxo de fluidos permite regular os gradientes químicos e, conseqüentemente, a formação de microambientes específicos. O controle espacial é a base da técnica e os modelos mais sofisticados envolvem equipes multidisciplinares para a criação de canais padronizados de tamanho micrométrico (*multipatterning*) em moldes de biopolímero^{53,119,120,121}.

A microfluídica, aliada à cultura de células 3D, possibilitou o cultivo de órgãos em *chips*, onde os microcanais preenchidos com meios de cultura interligam cavidades de formatos específicos que mimetizam os órgãos de onde as células são retiradas¹²². As células são cultivadas nessas cavidades específicas e a interação entre os diferentes tipos celulares, que formam os órgãos sobre o *chip*, ocorre por meio dos microcanais. Essa comunicação possibilita o estudo toxicológico sistêmico¹²³, pois a microfluídica permite a interligação de câmaras que mimetizam órgãos

diferentes, os chamados "*body-on-a-chip*"^{124,125,126}. Somado a esse sistema sobre *chip*, forças mecânicas podem ser empregadas ao substrato onde as células são cultivadas de modo a gerar estímulos que mimetizem o observado *in vivo*, como, por exemplo, a contração cardíaca e o movimento de inspiração e expiração pulmonar^{127,128}. Esses estímulos mecânicos modulam o comportamento celular tornando o sistema mais fisiológico¹²⁹. O potencial destes modelos na área de bioengenharia e de substituição de experimentação animal é inegável.

Vantagens e limitações

Não restam dúvidas de que os modelos 3D de cultura de células, por mimetizarem melhor as condições *in vivo*, trouxeram grandes avanços em diversas áreas do conhecimento, o que inclui influência do microambiente em diversas propriedades celulares (expressão de genes e proteínas, proliferação, morte, migração e diferenciação), morfogênese, modelagem de doenças e ensaios de citotoxicidade para avaliação de novos fármacos^{46,47,48,49,50,51,53,54,55,63,64,73}. Além disso, esses sistemas abrem a possibilidade de serem realizados estudos personalizados, com o cultivo de células extraídas de tecidos *ex vivo* (culturas primárias) em sistemas mais fisiológicos. Assim, cada indivíduo teria suas próprias células cultivadas em diferentes modelos e sua resposta celular seria testada frente a drogas a serem estudadas para o desenvolvimento de medicamentos ou terapias específicas para o indivíduo em questão^{74,120,130,131,132,133}.

A grande maioria destes modelos permite fácil manipulação, teste rápido de hipóteses e análises em tempo real, quando comparados a modelos *in vivo*. Portanto, estes sistemas são candidatos a métodos alternativos ao uso de animais em experimentação. De fato, em algumas áreas, como na de citotoxicidade de cosméticos, modelos *in vitro* 3D estão sendo utilizados em substituição ao teste *in vivo*, erradicado em vários países. No entanto, mesmo nesta área, algumas limitações do modelo devem ser consideradas, como veremos.

A escolha do modelo, que deve levar em conta vários fatores, como o tipo celular e a aplicação do estudo é fundamental na reprodutibilidade dos resultados. Por exemplo, células epiteliais de revestimento podem formar múltiplas camadas ou não, mas encontram-se apoiadas sobre membrana basal e apresentam uma polarização baso-apical. Por outro lado, alguns tipos celulares encontram-se imersos em uma matriz extracelular com características próprias. Exemplificando, osteoblastos estão associados a uma matriz rígida por associação de cristais de hidroxiapatita com moléculas de colágeno I, num processo denominado de mineralização da matriz. Ou seja, o tipo de molde pode ter impacto nos resultados obtidos. Como vimos, os componentes da matriz extracelular incluem uma grande variedade de moléculas, que se associam entre si e ligam fatores de crescimento e citocinas, criando microambientes específicos. As diferenças na composição da matriz alteram sua organização tridimensional, suas propriedades mecânicas e o gradiente químico^{27,29,32}. Não só, mas a polimerização de alguns componentes da matriz pode criar diferenças estruturais que impactam as propriedades celulares. Por exemplo, diferenças no diâmetro das fibrilas e na porosidade da matriz



de colágeno I derivada de rabo de rato ou de derme de bovino tiveram impacto na migração de linhagens celulares tumorais¹³⁴. O grupo de Tatiana Coelho-Sampaio mostrou que o pH altera o padrão de polimerização da laminina, o que, por sua vez, modifica o comportamento de diversos tipos celulares^{68,135,136}. A variação na polimerização destes biopolímeros também ocorre em função de diferenças na sua extração, como no caso do matrigel, que é comercialmente disponível, mas que varia de lote para lote na sua propriedade de induzir tubulogênese, o que certamente tem impacto na reprodutibilidade dos resultados^{54,137}. Ou seja, ainda é desafiador reproduzir, nas condições de cultura, as propriedades mecânicas, a porosidade, a elasticidade e o gradiente químico da matriz extracelular dos tecidos. Mesmo no caso dos órgãos engenheirados, os modelos de órgãos em *chip*, mimetizar a proporção de massa e volume ou determinar os vários tipos celulares que serão incluídos são desafios que vão além da microfluídica e da engenharia de arcabouços que mimetizem órgãos¹³⁸. Ou seja, é necessária a padronização dos modelos, com critérios bem definidos, para reduzir a variação nos resultados. Além disso, o custo deve ser levado em conta, assim como a ausência de métodos controlados de avaliação em larga escala dos efeitos obtidos^{53,54}.

A utilização dos modelos 3D de cultura em substituição ao uso de animais em experimentação deve levar em consideração ainda que mesmo os modelos mais complexos representam somente parcialmente as características dos órgãos e tecidos. Ou seja, o microambiente é mais simples do que o observado *in vivo* e, portanto, diversos mecanismos fisiopatológicos não são reproduzidos. *In vivo*, diversos sistemas interagem e, portanto, o microambiente é mais complexo, com contribuição de células do sistema linfematopoiético e nervoso, além do vascular, já abordado. Macrófagos, células dendríticas, apresentadoras de antígeno, e linfócitos, entre outras, compõem o microambiente, mas estão ausentes na grande maioria dos modelos, comprometendo a avaliação de efeitos inflamatórios e de hipersensibilidade^{47,63}. Finalmente, os sistemas de cultura desenvolvidos até o

momento, além das limitações espaciais, têm limitação temporal, pois são sistemas que mimetizam eventos de curta duração, enquanto *in vivo* os eventos se sucedem, ou seja, progridem⁴⁷.

CONCLUSÕES

A busca por modelos *in vitro* alternativos ao uso de animais de laboratório, em consonância com a política dos 3Rs, e que, ao mesmo tempo permitam alcançar resultados reprodutíveis e preditivos dos obtidos em ensaios clínicos, é imperativa. Neste sentido, sistemas de cultura 3D de células, que mimetizam a complexidade dos tecidos, têm sido desenvolvidos. De forma geral, permitem interações célula-célula e entre estas e a matriz extracelular, depositada pelas próprias células ou derivadas de matriz natural ou sintética, o que leva a uma organização morfológica das células e regula suas propriedades biológicas. Além disso, gradientes físicos e químicos podem se formar nestes modelos, o que também contribui para a modulação do comportamento das células. A escolha do modelo deve levar em conta não só o tipo de tecido-alvo, mas também o efeito que se objetiva averiguar, pois as vantagens, assim como as limitações, são próprias de cada modelo. O próprio aspecto inovador dos modelos de cultura 3D acompanha-se de desafios a sua validação como modelo substitutivo aos ensaios clássicos. Um aspecto fundamental, que é a reprodutibilidade dos resultados, depende da harmonização de protocolos, da padronização de métodos de cultivo em diferentes laboratórios, das boas práticas em métodos *in vitro*, da realização de ensaios multilaboratoriais, da automação dos métodos de análise e de avaliações de vias de efeito adverso, como recomendado por organizações internacionais, como a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*). Apesar desses desafios, os sistemas de cultura 3D são um passo na direção de modelos mais próximos da complexidade dos tecidos e, portanto, são bons candidatos a modelos alternativos ao uso de animais de experimentação.

REFERÊNCIAS

1. U.S. Department of Energy. Human genome project information archive 1999-2003. Washington, DC: U.S. Department of Energy; 2015 [acesso 11 ago 2017]. Disponível em: http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/index.shtml
2. Venter JC, Smith HO, Adams MD. The sequence of the human genome. *Clin Chem*. 2015;61(9):1207-8. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.237016>
3. Migliaccio AR, Quarto R, Piacibello W. Cell therapy: Filling the gap between basic science and clinical trials October 15-17, 2001, Rome, Italy. *Stem Cells*. 2001;21(3):348-56. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-3-348>
4. Nabel GJ. Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. *Nat Med*. 2004;10:135-41. <https://doi.org/10.1038/nm990>
5. Chien KR. Regenerative medicine and human models of human disease. *Nature*. 2008;453(7193):302-5. <https://doi.org/10.1038/nature07037>
6. Abdeen AA, Saha K. Manufacturing cell therapies using engineered biomaterials. *Trends Biotechnol*. 2017;35(10):971-82. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.008>
7. Petricciani J, Hayakawa T, Stacey G, Trouvin JH, Knezevic I. Scientific considerations for the regulatory evaluation of cell therapy products. *Biologicals*. 2017;50:20-6. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.08.011>
8. Twigger AJ, Scheel CH. Advances in stem cells and regenerative medicine: single-cell dynamics, new models and translational perspectives. *Development*. 2017;144(17):3007-3011. <https://doi.org/10.1242/dev.153569>



9. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010;329(5987):52-6. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>
10. Annaluru N, Muller H, Mitchell LA et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*. 2014;344(6179):55-8. <https://doi.org/10.1126/science.1249252>
11. Bosley KS, Botchan M, Bredernood AL, Carroll D, Charo RA, Corn J et al. CRISPR germline engineering—the community speaks. *Nat Biotech*. 2015;33(5):478-86. <https://doi.org/10.1038/nbt.3227>
12. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017;548(7668):413-19. <https://doi.org/10.1038/nature23305>
13. Edwards C. American biotechnology needs a strategic planning center. *Nat. Biotech*. 1983;1(1):7. <https://doi.org/10.1038/nbt0383-7a>
14. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Preparing for future products of biotechnology. Washington, DC: The National Academies; 2017.
15. Senado Federal (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal; 1988.
16. Brasil. Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 5 fev 1997.
17. Brasil. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 28 mar 2005.
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução - RDC Nº 9, de 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 16 mar 2011.
19. Basketter DA, Clewell H, Kimber I, Rossi A, Blaauboer B, Burrier R et al. A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing - t4 report. *ALTEX*. 2012;29(1):3-91. <https://doi.org/10.14573/altex.2012.1.003>
20. Burden N, Sewell F, Chapman K. Testing chemical safety: what is needed to ensure the widespread application of non-animal approaches? *PLoS Biol*. 2015;13(5):e1002156. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002156>
21. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. New York: John Wiley & Sons; 2005.
22. Meleady P, O'Connor R. General procedures for cell culture. In: Celis JE, editor. *Cell biology: a laboratory handbook*. 3rd ed. New York: Elsevier; 2006. p. 13-20.
23. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 1):19-29. <https://doi.org/10.1242/jcs.00930>
24. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(5):509-14. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00101-7)
25. Huvneers S, Rooij J. Mechanosensitive systems at the cadherin-F-actin interface. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 2):403-13. <https://doi.org/10.1242/jcs.109447>
26. Twiss F, Rooij J. Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(21):4101-16. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1329-x>
27. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326(5957):1216-9. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
28. Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(5):a005033. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005033>
29. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):771-85. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
30. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
31. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009;324(5935):1673-7. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>
32. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):802-12. <https://doi.org/10.1038/nrm3896>
33. Rossi MI, Barros AP, Baptista LS, Garzoni LR, Meirelles MN, Takiya CM et al. Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional *in vitro* culture system for the study of hematopoietic cell migration. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(10):1455-62. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005001000002>
34. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):75-82. <https://doi.org/10.1038/nrm2594>
35. Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(5):830-3. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>
36. Bonfim DC, Dias RB, Fortuna-Costa A, Chicaybam L, Lopes DV, Dutra HS et al. PS1/ γ -secretase-mediated cadherin cleavage induces β -catenin nuclear translocation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3865315. <https://doi.org/10.1155/2016/3865315>



37. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(13):5431-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701152104>
38. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(12):5510-4. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
39. Young EW, Beebe DJ. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem Soc Rev*. 2010 Mar;39(3):1036-48. <https://doi.org/10.1039/b909900j>
40. Bollenbach T, Heisenberg CP. Gradients are shaping up. *Cell*. 2015;161(3):431-2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.009>
41. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein—basic fibroblast growth factor—is stored within basement membrane. *Am J Pathol*. 1988;130(2):393-400.
42. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):11-21. <https://doi.org/10.1038/nrm2319>
43. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol*. 2010;695:155-68. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7037-4_11
44. Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*. 2010;6(2):103-15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.01.011>
45. Rossi MI, Borojevic R. Homeostasia dos tecidos. In: Gehn PM, organizador. *Tratado de oncologia*. São Paulo: Atheneu; 2013. Vol. 1, p. 232-44.
46. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):211-24. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>
47. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601-10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006>
48. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 13):3015-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>
49. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
50. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5517-27. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
51. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
52. Oudin MJ, Weaver VM. Physical and chemical gradients in the tumor microenvironment regulate tumor cell invasion, migration, and metastasis. Cold Spring Harbor Lab Press. 2016;81:189-205. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030817>
53. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-77. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
54. Verjans ET, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: worth the effort? *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2993-3003. <https://doi.org/10.1002/jcp.26052>
55. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation *in vitro*: a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(5):405-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009>
56. Olsavsky KM, Page JL, Johnson MC, Zarbl H, Strom SC, Omiecinski CJ. Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(1):42-56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.032>
57. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*. 1997;137(1):231-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.1.231>
58. Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P et al. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(25):14821-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14821>
59. Goodbye, flat biology? [Editorial]. *Nature*. 2003;424(6951):861. <https://doi.org/10.1038/424861b>
60. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. 2003;424(6951):870-2. <https://doi.org/10.1038/424870a>
61. Andrade LR, Arcanjo KD, Martins HS, dos Reis JS, Farina M, Borojevic R et al. Fine structure and molecular content of human chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Cell Biol Int*. 2011;35(3):293-7. <https://doi.org/10.1042/CBI20100273>
62. Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Characterization and evaluation of chitosan matrix for *in vitro* growth of MCF-7 breast cancer cell lines. *Biomaterials*. 2004;25(21):5147-54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.025>
63. Shamir ER, Ewald AJ. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(10):647-64. <https://doi.org/10.1038/nrm3873>
64. Choi J, Lee EK, Choo J, Yuh J, Hong JW. Micro 3D cell culture systems for cellular behavior studies: culture matrices, devices, substrates, and *in-situ* sensing methods. *Biotechnol J*. 2015;10(11):1682-8. <https://doi.org/10.1002/biot.201500092>
65. Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res*. 1978;38(11 Pt 2):4155-71.



66. Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol.* 1983;97(1):153-65. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.1.153>
67. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988;107(4):1589-98. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.4.1589>
68. Freire E, Gomes FC, Linden R, Neto VM, Coelho-Sampaio T. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4867-76. <https://doi.org/10.1242/jcs.00173>
69. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001;294(5547):1708-12. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>
70. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 2003;160(2):267-77. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209006>
71. Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development.* 2001;128(16):3117-31.
72. Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.* 2007;4(4):359-65. <https://doi.org/10.1038/nmeth1015>
73. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* 2014;345(6194):1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
74. Bartfeld S, Clevers H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl).* 2017;95(7):729-38. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>
75. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262-5. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
76. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science.* 2013;340(6137):1190-4. <https://doi.org/10.1126/science.1234852>
77. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-9. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
78. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science.* 2016;352(6287):816-8. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6116>
79. Xinaris C, Brizi V, Remuzzi G. Organoid models and applications in biomedical research. *Nephron.* 2015;130(3):191-9. <https://doi.org/10.1159/000433566>
80. Jenkinson EJ, Van Ewijk W, Owen JJ. Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice. *J Exp Med.* 1981;153(2):280-92. <https://doi.org/10.1084/jem.153.2.280>
81. Thesleff I, Sahlberg C. Organ culture in the analysis of tissue interactions. *Methods Mol Biol.* 2008;461:23-30. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-483-8_3
82. Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G. In vitro models of T cell development. *Semin Immunol.* 1999;11(1):3-12. <https://doi.org/10.1006/smim.1998.0151>
83. Plum J, De Smedt M, Verhasselt B, Kerre T, Vanhecke D, Vandekerckhove B et al. Human T lymphopoiesis. In vitro and in vivo study models. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917(1):724-31. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05436.x>
84. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(11):5665-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5665>
85. Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol.* 1992;262(6 Pt 1):L713-24. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.6.L713>
86. Karp PH, Moninger TO, Weber SP, Nesselhauf TS, Launspach JL, Zabner J et al. An in vitro model of differentiated human airway epithelia: methods for establishing primary cultures. *Methods Mol Biol.* 2002;188:115-37. <https://doi.org/10.1385/1-59259-185-X:115>
87. Pezzulo AA, Starner TD, Scheetz TE, Traver GL, Tilley AE, Harvey BG et al. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300(1):L25-31. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00256.2010>
88. Azzopardi D, Haswell LE, Foss-Smith G, Hewitt K, Asquith N, Corke S et al. Evaluation of an air-liquid interface cell culture model for studies on the inflammatory and cytotoxic responses to tobacco smoke aerosols. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(7):1720-8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.016>
89. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol.* 1997;273(4 Pt 1):C1109-23. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1109>
90. Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int.* 1999;23(3):157-61. <https://doi.org/10.1006/cbir.1999.0384>
91. Layer PG, Robitzki A, Rothermel A, Willbold E. Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci.* 2002;25(3):131-4. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02036-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02036-1)
92. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1971;46(1):113-20. <https://doi.org/10.1093/jnci/46.1.113>



93. Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol.* 1998;79(1):1-23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1998.00051.x>
94. Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* 2004;22(4):195-202. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.002>
95. Haisler WL, Timm DM, Gage JA, Tseng H, Killian TC, Souza GR. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc.* 2013;8(10):1940-9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125>
96. Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R, de Meirelles MN. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis.* 2008 Mar;197(6):906-15. <https://doi.org/10.1086/528373PMID:18279074>
97. Barros AP, Takiya CM, Garzoni LR, Leal-Ferreira ML, Dutra HS, Chiarini LB et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D *in vitro* model. *PLoS One.* 2010;5(2):e9093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009093>
98. Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br J Cancer.* 1987;56(3):325-7. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.197>
99. Walenta S, Dötsch J, Bourrat-Flöck B, Mueller-Klieser W. Size-dependent oxygenation and energy status in multicellular tumor spheroids. *Adv Exp Med Biol.* 1990;277:889-93. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8181-5_102
100. Walenta S, Doetsch J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Metabolic imaging in multicellular spheroids of oncogene-transfected fibroblasts. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(4):509-22. <https://doi.org/10.1177/002215540004800409>
101. Timmins NE, Dietmair S, Nielsen LK. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis.* 2004;7(2):97-103. <https://doi.org/10.1007/s10456-004-8911-7>
102. Schmitz A, Fischer SC, Mattheyer C, Pampaloni F, Stelzer EH. Multiscale image analysis reveals structural heterogeneity of the cell microenvironment in homotypic spheroids. *Sci Rep.* 2017;7:43693. <https://doi.org/10.1038/srep43693>
103. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* 2009;4(3):309-24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
104. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 1998;143(5):1341-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.5.1341>
105. Garzoni LR, Rossi MI, Barros AP, Guarani V, Keramidas M, Balottin LB et al. Dissecting coronary angiogenesis: 3D co-culture of cardiomyocytes with endothelial or mesenchymal cells. *Exp Cell Res.* 2009;315(19):3406-18. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.016>
106. Laschke MW, Menger MD. Spheroids as vascularization units: from angiogenesis research to tissue engineering applications. *Biotechnol Adv.* 2017;35(6):782-91. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.002>
107. Lee JH, Lee DH, Lee S, Kwon CH, Ryu JN, Noh JK et al. Functional evaluation of a bioartificial liver support system using immobilized hepatocyte spheroids in a porcine model of acute liver failure. *Sci Rep.* 2017;7(1):3804. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03424-2PMID:28630420>
108. Dinh PC, Cores J, Hensley MT, Vandergriff AC, Tang J, Allen TA et al. Derivation of therapeutic lung spheroid cells from minimally invasive transbronchial pulmonary biopsies. *Respir Res.* 2017;18(1):132. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0611-0>
109. Howes AL, Chiang GG, Lang ES, Ho CB, Powis G, Vuori K et al. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(9):2505-14. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0698>
110. Barbone D, Yang TM, Morgan JR, Gaudino G, Broaddus VC. Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13021-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709698200>
111. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen.* 2004;9(4):273-85. <https://doi.org/10.1177/1087057104265040>
112. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.* 2010;148(1):3-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>
113. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst (Lond).* 2011;136(3):473-8. <https://doi.org/10.1039/COAN00609B>
114. Ivanov DP, Grabowska AM. Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. *Sci Rep.* 2017;7:41160. <https://doi.org/10.1038/srep41160>
115. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 2017;108(3):283-9. <https://doi.org/10.1111/cas.13155>
116. Chen W, Wong C, Vosburgh E, Levine AJ, Foran DJ, Xu EY. High-throughput image analysis of tumor spheroids: a user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *J Vis Exp.* 2014;(89):e51639. <https://doi.org/10.3791/51639>
117. Cisneros Castillo LR, Oancea AD, Stüllein C, Régnier-Vigouroux A. A novel computer-assisted approach to evaluate multicellular tumor spheroid invasion assay. *Sci Rep.* 2016;6(1):35099. <https://doi.org/10.1038/srep35099>



118. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R et al. 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*. 2016;6(1):19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
119. Lo RC. Application of microfluidics in chemical engineering. *Chem Eng Process Tech*. 2013;1:1002.
120. Duinen V, Trietsch SJ, Joore J, Vulto P, Hankemeier T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;35:118-26. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.05.002>
121. Picollet-D'hahan N, Dolega ME, Liguori L, Marquette C, Le Gac S, Gidrol X et al. A 3D Toolbox to enhance physiological relevance of human tissue models. *Trends Biotechnol*. 2016;34(9):757-69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.012>
122. Chen Y, Chan HN, Michael SA, Shen Y, Chen Y, Tian Q et al. A microfluidic circulatory system integrated with capillary-assisted pressure sensors. *Lab Chip*. 2017;17(4):653-62. <https://doi.org/10.1039/C6LC01427E>
123. Bovard D, Iskandar A, Luettich K, Hong J, Peitsch MC. Organ-on-a-chip: A new paradigm for toxicological assessment and preclinical drug development. *Toxicol Res Appl*. 2017;1:1-16. <https://doi.org/10.1177/2397847317726351>
124. Sung JH, Esch MB, Prot JM, Long CJ, Smith A, Hickman JJ et al. Microfabricated mammalian organ systems and their integration into models of whole animals and humans. *Lab Chip*. 2013;13(7):1201-12. <https://doi.org/10.1039/c3lc41017j>
125. Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, Hasenberg T, Ramme AP, Hübner J et al. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip*. 2015;15(12):2688-99. <https://doi.org/10.1039/C5LC00392J>
126. Miller PG, Shuler ML. Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(10):2213-27. <https://doi.org/10.1002/bit.25989>
127. Shimizu T, Yamato M, Itoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*. 2002;90(3):e40. <https://doi.org/10.1161/hh0302.105722>
128. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*. 2010;328(5986):1662-8. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
129. Bhise NS, Ribas J, Manoharan V, Zhang YS, Polini A, Massa S et al. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *J Control Release*. 2014;190:82-93. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.004>
130. Arrigoni C, Gilardi M, Bersini S, Candrian C, Moretti M. Bioprinting and Organ-on-chip applications towards personalized medicine for bone diseases. *Stem Cell Rev*. 2017;13(3):407-17. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9741-5>
131. Khazali AS, Clark AM, Wells A. A pathway to personalizing therapy for metastases using liver-on-a-chip platforms. *Stem Cell Rev*. 2017;13(3):364-80. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9735-3>
132. Jeppesen M, Hagel G, Glenthøj A, Vainer B, Ibsen P, Harling H et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an *in vitro* model for personalizing cancer medicine. *PLoS One*. 2017;12(9):e0183074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183074>
133. Fong EL, Toh TB, Yu H, Chow EK 3rd. Culture as a clinically relevant model for personalized medicine. *SLAS Technol*. 2017;22(3):245-53. <https://doi.org/10.1177/2472630317697251>
134. Wolf K, Te Lindert M, Krause M, Alexander S, Te Riet J, Willis AL et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol*. 2013;201(7):1069-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.201210152>
135. Barroso MM, Freire E, Limaverde GS, Rocha GM, Batista EJ, Weissmüller G et al. Artificial laminin polymers assembled in acidic pH mimic basement membrane organization. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11714-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709301200>
136. Hochman-Mendez C, Cantini M, Moratal D, Salmeron-Sanchez M, Coelho-Sampaio T. A fractal nature for polymerized laminin. *PLoS One*. 2014;9(10):e109388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109388>
137. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*. 2003;49(1):32-40. <https://doi.org/10.1373/49.1.32>
138. Takebe T, Zhang B, Radisic M. Synergistic engineering: organoids meet organs-on-a-chip. *Cell Stem Cell*. 2017;21(3):297-300. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.016>

Agradecimentos:

Os autores agradecem às Dras. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa, PhD, atualmente no Instituto de Traumatologia-Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil e Araci Maria da Rocha Rondon, PhD, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, pela colaboração na realização de culturas 3D com linhagens humanas de tumor de mama. Os autores agradecem ainda a Profa. Tatiana Lobo Coelho-Sampaio pelas informações a respeito do comportamento biológico de diferentes linhagens celulares cultivadas sobre matriz de laminina.

Financiamento e conflito de interesse

O trabalho foi financiado pelas agências de governo, Capes, Faperj e CNPq. Os autores declaram não ter conflito de interesses.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.