

ARTIGO DE REVISÃO

A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen

Jônatas Bussador do Amaral* e Gláucia Maria Machado-Santelli
Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências
Biomédicas, Universidade de São Paulo
Av Lineu Prestes 1524, ICB-1 sala 306, Cidade Universitária,
05508-900, São Paulo-SP, Brasil.
* amaraljb@gmail.com

ABSTRACT

Cell culture is characterized by maintaining live cells in the laboratory regardless of the organism in which they originated. This technique has contributed to better understanding of molecular cell mechanisms, permitting important scientific advances, for example, concerning vaccine production and tumor cell biology. Three-dimensional (3D) cell culture initially derived from commonly used cell cultures (monolayer cell cultures). As a particularity, a 3D cell culture permits cells to explore the three dimensions of the space thereby increasing cell-cell interactions, as well as interaction with the environment. When grown in this system, cells form structures known as multicellular spheroids. The interior of these spheroids present cell heterogeneity, microenvironment formation and different exposure to factors, such as nutrients and oxygen. Owing to the fact that these characteristics are very similar to those of *in vivo* avascular tumors, 3D cell culture advanced in various research lines, thus becoming a widely used model in radiology and chemotherapy essays. In studies related to breast cancer biology, spheroids are becoming widely used in the aim to comprehend luminal space morphogenesis.

Key words: the history of 3D cell culture, *in vitro* models, breast, multicellular spheroids

RESUMO

A cultura celular é caracterizada por permitir a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que a originou. A utilização desta técnica possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula permitindo importantes avanços científicos no que se refere, por exemplo, a produção de vacinas e a biologia da célula tumoral. A cultura de células em 3-dimensões (3D) derivou-se inicialmente da cultura de células comumente utilizadas (células em monocamada). O diferencial da cultura 3D é permitir que as células explorem as 3-dimensões do espaço, aumentando assim as interações com o ambiente e entre as células. Quando crescidas neste sistema, as células formam estruturas denominadas de esferóides multicelulares. Estes esferóides apresentam em seu interior uma heterogeneidade celular, formação de microambiente e exposição diferencial a diversos fatores como nutrientes e oxigênio. Pelo fato destas características se mostrarem muito semelhantes a tumores avasculares *in vivo*, a cultura de células 3D avançou em diversas linhas de pesquisa tornando-se um modelo bastante utilizado em ensaios radiológicos e de quimioterápicos. Em estudos relacionados à biologia do câncer de mama, vem ganhando espaço a utilização de esferóides para estudos que visam à compreensão da morfogênese do espaço luminal.

Palavras-chave: história da cultura de células em três-dimensões, modelos *in vitro*, mama, esferóides multicelulares.

CULTURA DE CÉLULAS- UM BREVE HISTÓRICO

O pioneirismo de Ross Granville Harrison (1870-1959) Influenciados pelas descobertas de Santiago Ramón y Cajal e Camillo Golgi, vários autores, no início do século 20, debruçavam-se sobre seus resultados (muitas vezes divergentes) com o objetivo de melhor se compreender o sistema nervoso (Keshishian, 2004). Harrison inseria-se neste contexto por trabalhar, entre outras linhas de pesquisa, com processos relacionados à formação de fibras nervosas. Visando compreender como estas se originavam e como ocorria à inervação dos órgãos em direção ao sistema nervoso central, ele desenvolveu um método que possibilitava a retirada de células de embriões de anfíbios mantendo-as vivas em laboratório (Harrison, 1907). Esse experimento consistia em colocar um fragmento de tecido (normalmente medula espinhal) imerso em uma gota de linfa de anfíbio vedado entre uma lamínula e uma lâmina de vidro (Figura 1). Tal procedimento mostrou-se bastante eficaz por permitir que Harrison acompanhasse o crescimento e a formação das fibras nervosas, mostrando pela primeira vez que somente o tecido nervoso possuía essa propriedade. Não limitado a área de neurociências o método de cultura celular assumiu um importante papel na pesquisa científica, sendo seu uso circunstancial para a compreensão da biologia da célula.

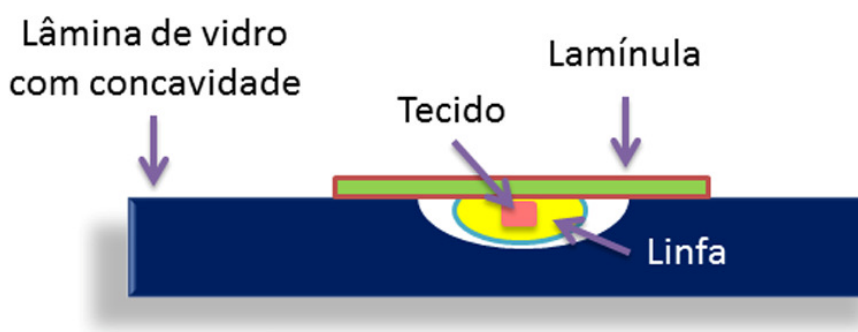


Figura 1. Esquema mostrando o experimento desenvolvido por Ross Granville Harrison

Alexis Carrel e o coração imortal de galinha (1873-1944)

Apesar de possuir notoriedade no meio científico devido aos seus ensaios sobre suturas em vasos sanguíneos (sendo até posteriormente laureado com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1912), Alexis Carrel possuía particular interesse na viabilidade e manutenção de órgãos *in vitro* em seus estudos com transplantes. Devido a isso, em paralelo com trabalhos que envolviam a experimentação animal, Carrel iniciou seus estudos com culturas de células. Ao entrar em contato com o trabalho desenvolvido por Harrison, ele focou os seus esforços não somente no estabelecimento da cultura celular *in vitro*, mas também na manutenção destas por períodos mais longos fora de organismos. Após enviar um auxiliar para aprender as técnicas de cultura de células no laboratório de Harrison, Carrel começou a desenvolver adaptações que as melhorasse. Inicialmente, adicionou uma série de banhos em soluções salinas para o preparo das culturas. Em paralelo a esse procedimento, substituiu o meio de cultura de linfa de anfíbio para

plasma de galinha e desenvolveu uma garrafa de cultura com uma entrada inclinada (Frasco de Carrel), o qual permitia a adição e substituição deste meio com maior facilidade. Outra modificação, talvez a mais importante e inovadora da época, foi a aplicação de um rígido controle de assepsia (sendo esta metodologia muitas vezes mantidas em segredo) (Witkowski, 1979). Com o sucesso de suas culturas em monocamada (Figura 2), a divulgação de seus trabalhos tomou tamanha proporção que muitos cientistas da época atribuíam a ele a descoberta da técnica de cultivo celular.

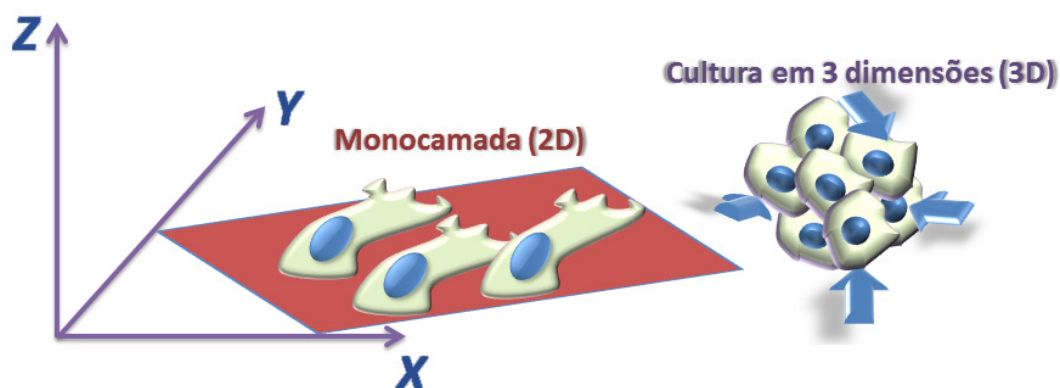


FIGURA 2. Esquema mostrando a diferença entre o arranjo espacial de culturas em monocamada e em 3 dimensões.

Neste contexto, um de seus assistentes chamado Eberling modificou a técnica desenvolvida por Carrel permitindo que a cultura de células derivadas de corações de galinha fosse sub-cultivada. O sucesso foi tão grande que Eberling repetiu este processo por 34 anos. Surgia assim a lenda do coração imortal de galinha (Friedman e Friedland, 2000). Foi analisando estas culturas de cardiomiócitos que Carrel notou que o maior contato das células com o meio de cultura tinha relação direta com a viabilidade celular e com uma maior taxa de proliferação. Ele percebeu que, devido a essas características, a região mais central de suas colônias apresentava elevado índice de necrose. Para resolver este problema ele cultivou os cardiomiócitos sobre uma superfície constituída por fios de seda.

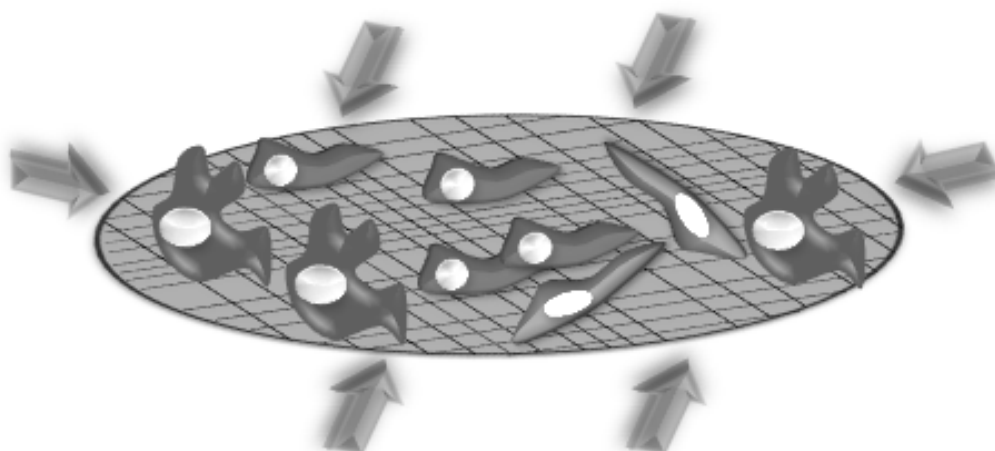


FIGURA 3. O crescimento das células sobre uma trama de seda permitiu uma maior interação com o ambiente. Este esquema ilustra o que talvez seja a primeira técnica de cultivo de células em 3-dimensões desenvolvida por Alexis Carrel.

Tal adaptação permitiu uma maior interação das células com o ambiente, sendo que este maior contato ocorreu em diferentes planos do espaço (Carrel, 1912). Com este experimento ocorria pela primeira vez uma descrição de uma cultura celular em 3 dimensões (Figura 2 e 3). Após os trabalhos de Carrel, o uso e aperfeiçoamento do cultivo celular em monocamada fizeram com que grandes descobertas científicas fossem alcançadas levando, por exemplo, a produção em larga escala de vacinas; maior compreensão dos mecanismos moleculares da célula e, entre outras aplicações, a exploração em maior detalhe da biologia da célula tumoral (Friedman e Friedland, 2000). Passariam aproximadamente 30 anos para que os trabalhos desenvolvidos por Johannes Holtfreter, Aron Arthur Moscona e Joseph Leighton explorassem e conseqüentemente divulgassem a cultura 3D no meio científico.

A CULTURA DE CÉLULAS EM 3 DIMENSÕES—HOLTFRETER, MOSCONA E LEIGHTON

A obtenção de resultados científicos utilizando fragmentos de tecidos mantidos *in vitro* ganhou um espaço significativo em estudos da biologia do desenvolvimento. Tal fato ocorreu, principalmente, devido ao sucesso da utilização de embriões nestes trabalhos. Com o freqüente uso desta metodologia era de se esperar que, em um primeiro momento, a cultura de células em 3 dimensões tivesse como divulgadores alguns embriologistas.

Johannes Holtfreter (1901–1992)

Devido aos seus trabalhos relacionados à morfogênese do embrião, Holtfreter tornou-se um dos mais reconhecidos pesquisadores na área de biologia do desenvolvimento. A sua relação com experimentos que envolvessem a cultura em 3 dimensões ocorreu inicialmente em estudos que mostraram a afinidade entre os tecidos de um organismo, evidenciando neste contexto a importância da adesão celular. Em um dos seus experimentos este autor separou os diferentes folhetos embrionários de um embrião e, em laboratório, os colocou novamente em contato. Além das células se reagruparem nos seus respectivos folhetos, estes agrupamentos celulares possuíam um grau de diferenciação equivalente a sua origem embrionária (Byrnes, 2009). Em 1944, Holtfreter descreveu um método para a geração de agregados celulares esféricos que consistia em adicionar ágar na superfície de placas de Petri, evitando assim que as células aderissem ao fundo da placa (Holtfreter, 1944). Posterior a isso, em 1947, ele derivou o método de formação de culturas 3D adicionando um aparato que permitisse o movimento das placas de Petri, reduzindo ainda mais a interação das células com o substrato (Holtfreter, 1947).

Aron Arthur Moscona (1921-2009)

Os trabalhos desenvolvidos por Moscona entre 1950 e 1970 tinham como eixo comum a análise de como as células embrionárias individuais se organizavam originando tecidos e órgãos. Utilizando enzimas como tripsina e hialuronidase ele dissociou tecidos de diferentes organismos e percebeu, em uma análise inicial, que as células de órgãos diferentes não se misturavam. Desta maneira, células derivadas de cartilagem de embriões de aves ficavam unidas com suas congêneres e não se misturavam com células de rim, por exemplo. Moscona também foi um dos pioneiros na produção de quimeras, método o qual consiste na manutenção de células originadas de diferentes organismos os quais permanecem unidas por possuírem moléculas de superfície de membrana que tenham afinidade (Moscona, 1957). Moscona também descreveu a importância do reconhecimento célula-célula e trouxe a luz informações importantes sobre a complexidade inerente aos organismos. Os desdobramentos dos seus resultados levaram a descoberta de estruturas importantes nas células, entre elas podemos citar como exemplo as caderinas (Winzler, 1970).

Joseph Leighton 1921-1999

Em 1951, o cultivo de células *in vitro* era, predominantemente, baseado no crescimento celular em monocamada. Leighton, que na época trabalhava com diagnósticos patológicos e histogênese, viu que mesmo sendo muito importante para essa época, esse paradigma possuía limitações. Para ele, a idéia de um mundo achatado estava distante de um organismo e uma visão reducionista abalizada em estudos com células individuais teria que ser modificado (Schaeffer, 1999). Foi neste contexto que este autor revisitou os trabalhos desenvolvidos por Carrel (Carrel, 1912), visando agora desenvolver um método que levasse em conta a tridimensionalidade. Em seu trabalho (Leighton, 1951), adicionou células e/ou fragmentos de tecidos em um substrato constituído por esponjas de celulose. Em seguida, Leighton adicionou a esse conjunto um pouco de plasma extraído de embriões de aves. Após a coagulação, os agregados formados por plasma, células e a esponja foram colocado em um recipiente com agitação com posterior adição de nutrientes.

A preocupação com a manutenção da arquitetura tecidual fez com que Leighton se diferenciasse dos autores descritos até agora. Em seu trabalho de 1954 (Leighton, 1954) ele descreveu alguns aspectos importantes da cultura em 3 dimensões, sendo eles:

- O arranjo tridimensional possibilita que células migrem para todas as direções.
- O sistema 3D permite um aumento da superfície celular.
- A difusão presente no interior dos agregados pode reter fatores secretados pelas células

- O modelo pode permitir um gradiente de difusão capaz de gerar uma alteração na morfologia celular, podendo iniciar processos relacionados à diferenciação tecidual

O gradativo aprimoramento nas técnicas de cultura de células em 3-dimensões fez com que, após os trabalhos de Leighton, houvesse uma distinção muito clara entre os resultados em monocamada e os desenvolvidos em ambiente 3D. A decorrente irradiação desta técnica em diferentes métodos e aplicações é somente uma amostra da importância daquele ano de 1951 onde, em laboratório, a cultura de células começaria a se aproximar a experimentos *in vivo*.

O SURGIMENTO DOS TUMORES ESFERÓIDES MULTICELULARES

Células tumorais e cultura 3D

A utilização da cultura de células tumorais crescidas em ambiente tridimensional já era feita desde os trabalhos iniciais desenvolvidos por Moscona (Moscona, 1957), o qual analisou a interação de células de melanoma em agregados celulares que ele denominou de quimeras. Esses agregados apresentavam uma morfologia semelhante aos tumores que os originaram, mantendo até as propriedades invasivas quando estas eram crescidas em associação com células normais. Já Halpern e seus colaboradores (Halpern, Pejsachowicz *et al.*, 1966) mostraram que o arranjo destes agregados bem como a sua tumorigenicidade eram diferentes quando se utilizava células normais do que quando se utilizava células tumorais. Como já comentado, foi o trabalho de McAllister e colaboradores (McAllister, Reed *et al.*, 1967) que realmente abordou o comportamento diferenciado das células malignas. A morte das células normais na presença de uma superfície de ágar era, para esses autores, uma prova das células normais dependiam da ancoragem desta célula ao substrato. Sabia-se já naquela época que células derivadas de tumores malignos perderiam essa dependência de ancoragem, sendo esta característica então refletida na sobrevivência das células na cultura 3D.

Apesar de iminente, a sistematização e padronização de um modelo que mimetizasse o ambiente e metabolismo de um tumor ainda não tinham sido concretizadas. Isso iria mudar após os trabalhos desenvolvidos por Sutherland e seus colaboradores em 1970.

Pequenos tumores *in vitro* - o surgimento dos esferóides

A criação de modelos que permitissem testes de efeito e de intensidade de radiação direcionou Robert M. Sutherland e outros pesquisadores à utilização de cultura de células em 3D. Trabalhando inicialmente com linhagens derivadas de pulmão de Hamster, esse grupo desenvolveu uma técnica que utilizava frascos que permitiam um fluxo do meio de cultura no seu interior (*spinner flasks*), impedindo assim adesão das células com o substrato. Como consequência, os agregados de células assumiram uma morfologia esférica a qual fez com que esses autores os denominassem de esferóides multicelulares (Inch, Mccredie *et al.*, 1970; Sutherland,

McCredie *et al.*, 1971). Como a formação de esferóides também era observada em células derivadas de carcinomas mamários bem como de outros cânceres (Sutherland e Durand, 1972), iniciou-se o desenvolvimento de estudos que buscassem similaridades entre os resultados encontrados na cultura 3D com os encontrados *in vivo*. O desdobramento destes experimentos levou o grupo de Sutherland a conseguir mostrar que, quando submetidos a um tratamento com radiação, os esferóides¹ multicelulares apresentavam curvas de sobrevivência celular análogas às de tumores sólidos (Sutherland, Inch *et al.*, 1970; Sutherland, McCredie *et al.*, 1971). Diferentes linhas de pesquisa agora focariam um aspecto importante deste modelo- a heterogeneidade celular.

Em ambiente 3D as células não são igualmente expostas ao meio. Tal fato faz com que haja a formação de microambientes que, no interior dos esferóides, podem levar a seleção de diferentes grupos celulares (Kim, 2005). Decréscimos regionalizados de tomada de oxigênio e nutrientes podem levar, neste contexto, a formação de áreas de necrose nestes esferóides. Ao se olhar para essas características, paralelos com tumores sólidos (principalmente avasculares) são inevitáveis. Diferentes frentes de análise que exploram essas similaridades foram desenvolvidas, sendo algumas representadas na Figura 4.

Esferóides: semelhanças entre modelos, vantagens e aplicações

Como já comentado, estudos envolvendo a terapia radiológica foram uma das primeiras linhas de pesquisa bastante exploradas por meio de cultivo celular 3D. Resultados mostrando as diferenças entre o ambiente 2D e 3D, principalmente no que se refere a resistência das células (Durand e Sutherland, 1972), direcionaram esta abordagem experimental para diversas linhas de pesquisa, como por exemplo estudos relacionados a radiação ionizante, a geração de radicais livres, inibição da respiração celular e toxicidade preferencial em regiões de hipóxia (Durand e Brown, 1980; Siemann e Sutherland, 1980). Posteriormente ao grande número de trabalhos produzidos na década de 70 e 80, experimentos que envolvam cultura 3D e ensaios radioterápicos atualmente vêm trazendo informações importantes a respeito do papel de substâncias radiosensibilizantes (Stephanie, Inga *et al.*, 2009) e radioprotetoras (Stephanie, Iris *et al.*, 2009) em algumas vias de sinalização celulares. Outros autores (Storch, Eke *et al.*, 2010) mostraram que o arranjo da cromatina de células organizadas em esferóides é alterado, apontando assim para uma inter-relação entre morfologia e radiosensibilidade celular.

Aplicação importante dos esferóides é também o seu uso em ensaios que envolvam testes de sensibilidade a drogas. Inicialmente, este tipo de aplicação esteve sempre associado à cultura de células crescidas em monocamada. Todavia, percebeu-se que o efeito de algumas concentrações de drogas não tinham equivalência *in vivo* dos valores encontrados na cultura 2D. Muitas evidências têm mostrado que células arranjadas em esferóides, principalmente as localizadas no interior destes agregados, são muito mais resistentes a agentes citotóxicos do que

¹ No decorrer de todo o texto será utilizado o termo esferóide ao invés de tumores esferóide multicelulares

células em suspensão na cultura. Dos vários trabalhos inicialmente desenvolvidos, podemos citar como exemplos estudos que mostraram maior resistência aos quimioterápicos doxorubicina, vincristina e mitoxantrona em esferóides do que em linhagens em monocamada (Sutherland, Eddy *et al.*, 1979; Bichay e Inch, 1987; Kerr, Wheldon *et al.*, 1988). Tal diferença não é apenas uma resultante de problemas de difusão destas drogas no interior do esferóide. Fatores como alterações de pH, hipóxia e diferentes taxas de proliferação celular também estão envolvidos nesta maior resistência (Jaaskelainen, Kalliomaki *et al.*, 1989; Lin e Chang, 2008). A presença destes diferentes fatores faz com que o modelo de cultura de células em 3D seja o modelo *in vitro* que mais se aproxima com modelos *in vivo* (Mueller-Klieser, 1987; Friedrich, Ebner *et al.*, 2007; Hirschhaeuser, Menne *et al.*, 2010), pois, similarmente ao já mostrado em ensaios de radioterapia, esferóides também apresentam curvas de resistência a drogas semelhantes às encontradas em alguns tumores sólidos (Miller, Miller *et al.*, 1985; Steeg, Alley *et al.*, 1994; Kunz-Schughart, Freyer *et al.*, 2004).

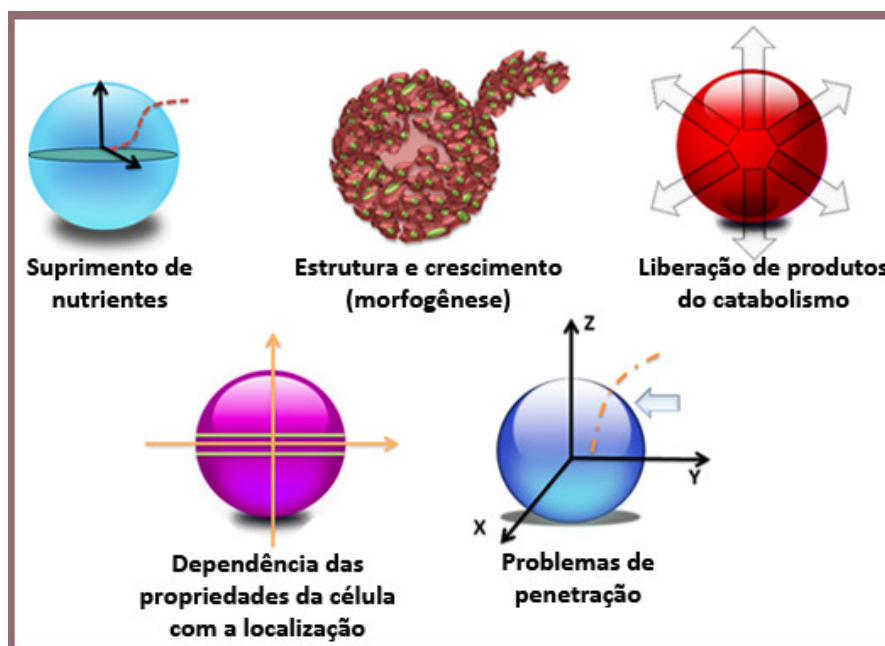


FIGURA 4. Ilustração esquemática mostrando diferentes linhas de pesquisa que podem ser estudadas nos tumores esferóides multicelulares. Adaptado de (Carlsoon e Yuhas, 1984)

A cultura de esferóides também se destaca por conseguir restabelecer características morfológicas e funcionais de seu equivalente tecido *in vivo*. Um dos fatores responsáveis por isto é a crescente produção de componentes de matriz extracelular o qual permite a criação de uma complexa rede tridimensional onde protagoniza um grande número de interações célula-célula bem como célula-matriz. A descrição e localização de fatores (pato) fisiológicos, bem como penetração, ligação e bioatividade de drogas podem ser então simulados nestes modelos que exploram esse arranjo 3D (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Elliott e Yuan, 2011)

Tanto a similaridade com regiões avasculares de pequenos tumores, quanto com as regiões intervasculares de grandes tumores sólidos tornam o modelo 3D peculiar. Como explicado anteriormente, tal característica mostrou-se muito útil em estudos que envolviam testes com radioterapia. Adicionado a este fato, os esferóides mostram uma cinética de crescimento que não somente podem ser calculada pela equação de Gompertz, como também por diferentes outros modelos matemáticos relacionados ao crescimento de tumores (Chignola, Schenetti *et al.*, 2000; Kim, Park *et al.*, 2009). Conseqüentemente, são também estabelecidos paralelos no tocante ao gradiente de proliferação. Como nos tumores, a periferia dos esferóides (região cortical) é o local onde ocorre o maior índice de proliferação celular. Á partir deste ponto, se traçarmos uma linha radial em direção ao centro (região medular do esferóide) torna-se evidente o crescente número de células que não estão em ciclo celular. Ao redor de 400 μm da superfície do esferóide, é possível observar o início de áreas de necrose. A complexidade do modelo ocorre devido à presença de microambientes com diferentes exposições a nutrientes, fatores de crescimento e a trocas gasosas. O agrupamento de células também altera o fluxo de liberação de catabólitos, tornando a sua forma de liberação bastante heterogênea. Estas variações afetam diretamente a fisiologia celular tanto em esferóides quanto em tumores. Desta forma, experimentos com esferóides podem *in vitro* mimetizar alguns aspectos da complexidade tumoral (Kunz-Schughart, Kreutz *et al.*, 1998; Mazzoleni, Di Lorenzo *et al.*, 2009; Hirschhaeuser, Menne *et al.*, 2010)

A cultura de esferóides também permite que em laboratório se utilize do uso de co-cultivo de diferentes linhagens celulares (esferóides heterólogos). Tal abordagem possibilita crescer em associação uma célula de origem tumoral com diversas outras derivadas de linhagens normais. A adição, por exemplo, de fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune permite simular cada vez mais uma maior interação estroma-parênquima, características inerente de um arranjo tecidual (Feder-Mengus, Ghosh *et al.*, 2008; Morales e Alpaugh, 2009; Pietras e Östman, 2010).

Com o gradual aperfeiçoamento da técnica para a produção de esferóides, cada vez mais se observa a utilização deste modelo como método de varredura de alto desempenho. Isso significa que, anteriormente a grandes testes clínicos, as indústrias estão utilizando esferóides com o objetivo de validar o efeito de determinados compostos. Tal mudança é decorrente de alguns fatores:

- Redução de custos (Dimasi, Hansen *et al.*, 2003; Dimasi e Grabowski, 2007)
- Inadequação de determinados modelos animais para a compreensão de vias de sinalização de células humanas (Rangarajan, Hong *et al.*, 2004)
- Aspectos bioéticos relacionados ao uso de animais (Elliott e Yuan, 2011)
- Em determinadas condições, resultados obtidos em cultura 2D mostram-se muito distantes dos organismos analisados exigindo uma gradual substituição deste modelo por culturas 3D (Mueller-Klieser, 2000; Abbott, 2003).

Em síntese, é possível verificar que as muitas similaridades com modelos *in vivo* habilitam o uso esferóides como uma eficiente ferramenta de estudo *in vitro*. É

evidente que tanto a cultura em monocamada bem como modelos animais possuem um importante papel na pesquisa científica. Todavia, por possuir característica de ambas as técnicas, o seu crescente uso se justifica.

SIMULANDO A ORGANIZAÇÃO DO TECIDO MAMÁRIO: MORFOGÊNESE LUMINAL E CÂNCER

Como mostrado anteriormente, a alta incidência de casos bem como o elevado número de mortes mostram a importância da melhor compreensão dos mecanismos relacionados ao câncer de mama. Dentro deste objetivo, diversas frentes de pesquisa vêm utilizando a cultura de células em 3-dimensões visando, por exemplo, a obtenção de informações sobre:

- Papel das forças tensionais no arranjo tridimensional (Ingber, 2008)
- Processos relacionados à regulação da polaridade ápico-basal tanto epitélio normal quanto em epitélio tumoral (Schmeichel e Bissell, 2003).
- Arquitetura e homeostase tecidual (Ingram, Tschy *et al.*, 2010).
- Interferência na expressão fenotípica decorrente de interações célula-célula e célula matriz (Dhimolea, Maffini *et al.*, 2010).
- A formação e manutenção do arranjo glandular associado à presença de um lúmen e a sua desorganização decorrente de genes relacionados ao câncer (Kenny, Lee *et al.*, 2007).

Meio extracelular e alterações na morfologia dos esferóides

A utilização de células derivadas de tecidos mamários já vem ocorrendo desde as primeiras tentativas de cultura de células em 3D. Um dos primeiros experimentos utilizando essas células foi feito por Dabrowska-Piaskowska em 1959 (Dabrowska-Piaskowska, 1959). Esta autora dissociou diversos tipos de adenocarcinomas (inclusive mamário) e percebeu que quando as células formavam agregados elas desenvolviam a "capacitação histoformativa", que segundo a autora seria a capacidade das células se organizarem de maneira semelhante ao tecido que a originou. Posteriormente, com os avanços na técnica de cultivo, muitos trabalhos mostravam que a adição de componentes de matriz extracelular possibilitava modificações na morfologia celular. Tendo em vista estes processos, no final da década de 70, Yang e seus colaboradores (Yang, Richards *et al.*, 1979) perceberam que células derivadas de tecidos mamários (normal e tumoral) se arranjavam diferencialmente em ambiente 3D. Segundo eles, a presença de colágeno no meio de cultura possibilitou uma maior sobrevivência das células durante o experimento. Associado a isto, também se verificou alterações morfológicas que remetiam a formação de dutos, arranjo este que era somente encontrado *in vivo*. Passado alguns anos, Hall e seus colaboradores perceberam que ao utilizar método semelhante com células de mama normais era possível observar um arranjo luminal (Hall, Farson *et al.*, 1982). Eles observaram que na presença de colágeno tipo 1 as

células se organizavam de forma polarizada, formavam junções e a suas regiões apicais se voltavam para um espaço comum de maneira semelhante ao de uma glândula mamária. Desta maneira, cada vez mais, a pesquisa em câncer de mama se aproximava da geração modelos que mimetizavam a formação de lúmen.

Petersen e seu trabalho com componentes de membrana basal

Petersen e colaboradores (Petersen, Ronnov-Jessen *et al.*, 1992) perceberam que a diferenciação decorrente do ambiente 3D e da adição de colágeno tipo 1, mostrava-se pobre quando comparado com a organização tecidual. Devido a esse panorama, estes autores resolveram substituir a suplementação de colágeno por Matrigel ®. O experimento consistia em verificar o arranjo de células mamárias normais e tumorais em frente a essa nova condição. Os resultados encontrados mostraram que linhagens normais (MCF-10A e HMT-3522) bem como células extraídas de tecido mamário rapidamente assumiam um arranjo acinar. As células reorganizavam-se de forma polarizada, com junções celulares bem estabelecidas e apresentando também uma maior expressão de glicoproteínas na região apical bem como colágeno tipo IV na região basal. Quando comparadas com as células que eram crescidas em monocamada, ficava evidente que a presença do Matrigel e o ambiente 3D atuavam na diferenciação dos esferóides de células normais. Todavia, quando este protocolo era aplicado em células derivadas de tumor de mama e em linhagens tumorais, não era observada nestas células nenhuma diferenciação. Dois pontos devem ser aqui enfatizados:

- A utilização de Matrigel, após este trabalho, consolidou-se na pesquisa com esferóides de células mamárias por permitir em um curto espaço de tempo diferenciação e formação de estruturas acinares.
- Aspectos que diferenciavam linhagens tumorais de normais poderiam ser agora mais detalhados, pois vias de sinalização celulares eram diferentemente ativadas em ambiente rico em laminina.

Assim, os resultados apresentados por este grupo instigavam a comunidade científica a voltar o seu olhar para a matriz extracelular. Eles mostrariam, 5 anos mais tarde, que no contexto da biologia do câncer isso seria de grande importância.

Weaver e a reversão tumoral

Em 1987, Briand e colaboradores estabeleceram em laboratório uma nova linhagem celular chamada de HMT-3522. Originária de uma fibrose da mama, essa célula caracterizava-se por manter-se diplóide após várias passagens e também por não apresentar tumorigenicidade (Briand, Petersen *et al.*, 1987). O seu freqüente uso fez que alguns pesquisadores selecionassem a partir dela duas novas linhagens celulares: a não tumoral S1 e a tumoral T4-2. Weaver *et al.* (Weaver, Petersen *et al.*, 1997) iniciaram os seus trabalhos crescendo ambas as células em monocamada e cultura 3D. Apesar destas células possuírem uma origem comum, somente as células S1 se reorganizaram em estruturas acinares quando crescidas em culturas

3D com Matrigel. Já as células T4-2, nas mesmas condições, mostraram-se extremamente desorganizadas. A partir destes resultados, este grupo verificou que um receptor de matriz extracelular-a integrina $\beta 1$ -era muito mais expressa em T4-2 do que a linhagem não tumoral S1. Utilizando de anticorpos anti- integrina $\beta 1$, eles conseguiram diminuir a ligação deste receptor o com meio extracelular. Tal fato desencadeou uma mudança na morfologia destas células, fazendo com que as células T4-2 formassem ácidos muito semelhantes aos encontrados na linhagem não tumoral S1. Os fenótipos observados eram reversíveis quando as células eram dissociadas e os anticorpos removidos. Esses resultados apontaram para o fato de que, pelo menos *in vitro*, que a matriz extracelular e seus receptores poderiam ditar o fenótipo de células epiteliais de mama. Esse novo paradigma fez com que a tríade constituída por células mamárias, Matrigel e cultura de células em 3-dimensões fosse amplamente utilizada.

Processos relacionados à formação do lúmen

Como apresentado até agora, em esferóides de células mamárias a formação do lúmen se dá por uma gradativa diminuição do número de células da região medular. Ao final do desenvolvimento, o esferóide assume um arranjo acinar caracterizado por uma única camada de células ao redor de um espaço comum (Bissell e Radisky, 2001; Debnath, Muthuswamy *et al.*, 2003; Mills, K. R., Reginato, M. *et al.*, 2004). Visando entender como a apoptose atuava na formação desta cavidade, Jayanta Debnath e colaboradores começaram a estudar esferóides originados da linhagem não tumoral de mama MCF-10A [para saber mais sobre a origem desta linhagem ver (Soule, Maloney *et al.*, 1990)]. Neste trabalho (Debnath, 2002), eles modularam diferentes genes relacionados à proliferação celular (ciclina D1 e HPV E7) e ao controle da apoptose (proteínas anti apoptótica da família Bcl-2). Diferentemente do esperado, a inibição da apoptose e o aumento da proliferação celular não foram capazes de impedir a formação do lúmen. Estes autores mostraram então que talvez a morte celular por apoptose não seria a única responsável por essa diminuição do número de células. Fatores como a distância dos componentes da matriz extracelular e a crescente diminuição de nutrientes na região medular, apontavam para o também envolvimento de outra via de sinalização celular: a via autofágica .

A autofagia (macroautofagia) refere-se a qualquer via de degradação celular a qual, por meio de vesículas, envolva a entrega de elementos citoplasmáticos aos lisossomos. Este processo fisiológico, fortemente regulado pelo estresse celular e pela reciclagem de componentes intracelulares, possui importante papel no estudo da biologia da célula tumoral por associar-se a vias regulatórias que permitem ambigualmente tanto a supressão quanto a sobrevivência do tumor (Levine, 2007; Levine e Kroemer, 2008; Maiuri, Tasdemir *et al.*, 2008). No contexto descrito até agora, a maior concentração de células em autofagia encontra-se na região central dos esferóides (Debnath, Muthuswamy *et al.*, 2003; Mills, Kenna R., Reginato, Mauricio *et al.*, 2004; Underwood, Imbalzano *et al.*, 2006). Kenna R. Mills e

colaboradores exploraram a relação da morte por apoptose e autofagia também no modelo de esferóide com células MCF-10A (Mills, K. R., Reginato, M. *et al.*, 2004). Eles descreveram que o receptor TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) ativava a produção de autofagossomos nas células epiteliais. Ao se bloquear esse receptor juntamente com a apoptose, eles notaram um aumento de esferóides preenchidos por células, isto é, com a menor formação de cavidades. Além da formação luminal, a autofagia pode também atuar na região central dos esferóides diminuindo a morte celular decorrente por *anoikis* (Fung, Lock *et al.*, 2008). A literatura vem mostrando que ambas as vias são importantes para a formação do espaço luminal, todavia, a origem da linhagem de mama também pode impossibilitar a organização acinar destas células crescidas em ambiente 3D (Inman e Bissell, 2010).

Kenny e colaboradores (Kenny, Lee *et al.*, 2007) exploraram em seu trabalho as diferenças tanto morfológicas quanto de expressão gênica em linhagens de mama crescidas em ambiente 3D. Foram analisadas 25 linhagens, as quais poderiam apresentar um fenótipo normal ou um fenótipo tumoral (com diferentes graus de agressividade). Novamente, estes autores confirmaram que a formação de estruturas acinares somente ocorria em células normais. Já nas células tumorais, eles perceberam que quanto maior era o grau de tumorigenicidade, mais fraca era a interação das células no esferóide. Seguindo esta mesma abordagem, Han e colaboradores (Han, Chang *et al.*, 2010) conseguiram relacionar marcadores moleculares com expressão fenotípica de linhagens celulares de mama. Por meio deste método, foi possível estabelecer diferentes classes morfológicas (observadas somente em ambiente 3D) e, em cada uma destas classes, avaliar aspectos comuns como por exemplo a expressão de ERBB2 (aspecto importante para o prognóstico).

Devido a sua origem, a célula MCF-7 é uma linhagem mamária que apresenta um fenótipo tumoral (Soule, Vazquez *et al.*, 1973). Esferóides desta célula são bastante utilizados em diversos ensaios que envolvam testes de drogas e radioterapia (Ivascu e Kubbies, 2007; Debeb, Xu *et al.*, 2010). Células MCF-7 quando crescidas em ambiente 3D com Matrigel, formam esferóides que não apresentam estruturas luminiais. Esse fato fez com que alguns autores utilizassem essa linhagem para melhor compreender a formação luminal. A modulação de moléculas de adesão (Kirshner, Chen *et al.*, 2003), a utilização de co-cultura com fibroblastos (Krause, Maffini *et al.*, 2010) bem como um maior tempo de cultura 3D (Do Amaral, Urabayashi *et al.*, 2010) apontam para a possibilidade de reversão de algumas características tumorais.

Como apresentado até aqui, a pluralidade de fatores associados à formação do lúmen exige, cada vez mais, diferentes abordagens experimentais. Devido a isso, o gradual aumento da complexidade de interações celulares vem possibilitando em laboratório a geração de microambientes que emulem a realidade encontrada *in vivo* (Ghajar e Bissell, 2010). Neste contexto, diferentes linhas de pesquisa vêm mostrando a importância da interação de componentes de matriz extracelular e esferóides, principalmente no que se refere à alteração na morfologia (Do Amaral,

Urabayashi *et al.*, 2010), progressão tumoral (Bissell, Kenny *et al.*, 2005; Eritja, Llobet *et al.*, 2010) e expressão gênica (Spencer, Xu *et al.*, 2010).

CONCLUSÕES

Há quase 100 anos atrás, decorrente de uma pequena intervenção feita por Carrel em suas culturas, iniciavam-se os estudos com cultura de células em 3D. Desde então, o crescente uso e a diversidade de aplicações desta técnica, possibilitaram um olhar mais intimista ao que se refere às interações célula-célula e com o ambiente. Hoje, a cultura de células em 3D assume importante papel nos estudos relacionados à morfogênese luminal, permitindo acompanhar *in vitro* fatores regulatórios deste processo. Desta forma, o desenvolvimento de novos modelos de cultura de células em 3D são cada vez mais importantes devido a permitir uma melhor compreensão da formação do lúmen.

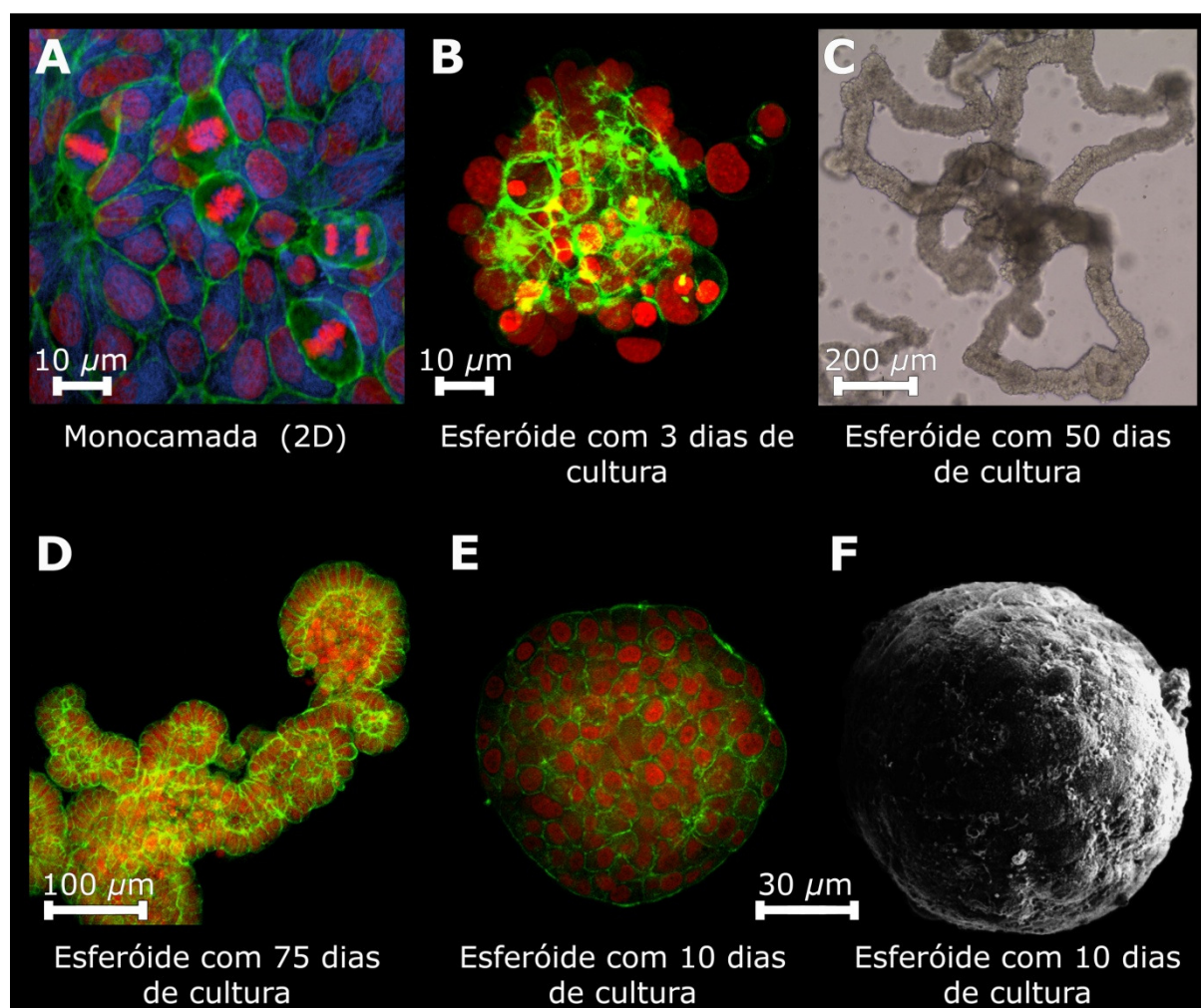


FIGURA 5. Prancha mostrando as alterações na morfologia de células tumorais de mama (MCF-7 de A-D e T47-D em E e F) quando crescidas em ambiente 3D. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser (A, B, D e E), microscópio eletrônico de varredura (F) e microscopia de luz com campo claro (C). Em vermelho é possível observar o núcleos das células, em verde filamentos de actina e em azul os microtúbulos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (processo número 06/01026-0), Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature*, v. 424, n. 6951, p. 870-872, 2003.
- BICHAY, T. J.; INCH, W. R. Resistance of V79 multicell spheroids to mitoxantrone: drug uptake and cytotoxicity. *Cancer Drug Delivery*, v. 4, n. (4), p. 201-211, 1987.
- BISSELL, M. *et al.* Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 70, p. 343 - 356, 2005.
- BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. *Nature Rev. Cancer*, v. 1, p. 46-54, 2001.
- BRIAND, P. *et al.* A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, v. 23, p. 181-188, 1987.
- BYRNES, W. M. Ernest Everett Just, Johannes Holtfreter, and the origin of certain concepts in embryo morphogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, v. 76, n. 10, p. 912-921, 2009.
- CARLSON, J.; YUHAS, J. M. Liquid-overlay culture of cellular spheroids *Recent Results in Cancer Research*, v. 95, p. 1-23, 1984.
- CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *Journal of Experimental Medicine*, v. 15, p. 516-528, 1912.
- CHIGNOLA, R. *et al.* Forecasting the growth of multicell tumour spheroids: implications for the dynamic growth of solid tumours. *Cell Proliferation*, v. 33, n. 4, p. 219-229, 2000.
- CUKIERMAN, E. *et al.* Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, v. 294, p. 1708-1712, 2001.
- DABROWSKA-PIASKOWSKA, K. Observations on the histoformative capacities of tumor cells dissociated by digestion with trypsin. *Experimental Cell Research*, v. 16, n. 2, p. 315-323, 1959.
- DEBEB, B. G. *et al.* Differential Radiosensitizing Effect of Valproic Acid in Differentiation Versus Self-Renewal Promoting Culture Conditions. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, v. 76, n. 3, p. 889-895, 2010.
- DEBNATH, J. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*, v. 111, p. 29-40, 2002.

- DEBNATH, J. *et al.* Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, v. 30, p. 256-268, 2003.
- DHIMOLEA, E. *et al.* The role of collagen reorganization on mammary epithelial morphogenesis in a 3D culture model. *Biomaterials*, v. 31, n. 13, p. 3622-3630, 2010.
- DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G. Economics of New Oncology Drug Development. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 2, p. 209-216, January 10, 2007 2007.
- DIMASI, J. A. *et al.* The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, v. 22, n. 2, p. 151-185, 2003.
- DO AMARAL, J. B. *et al.* Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. *Cell Biology International*, v. 34, n. 3, p. 267-274, Feb 1, 2010 2010.
- DURAND, R. E.; BROWN, S. M. Effects of lucanthone on chinese hamster V-79 cells I. Interaction with radiation in monolayers and spheroids. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*, v. 6, n. 11, p. 1525-1530, 1980.
- DURAND, R. E.; SUTHERLAND, R. M. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Experimental Cell Research*, v. 71, n. 1, p. 75-80, 1972.
- 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.
- ERITJA, N. *et al.* A Novel Three-Dimensional Culture System of Polarized Epithelial Cells to Study Endometrial Carcinogenesis. *The American journal of pathology*, v. 176, n. 6, p. 2722-2731, 2010.
- FEDER-MENGUS, C. *et al.* New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? *Trends Mol Med*, v. 14, n. 8, p. 333 - 340, 2008.
- FRIEDMAN, M.; FRIEDLAND, G. W. *Medicine's 10 Greatest Discoveries*. Yale University Press. ed. New Haven, 2000.
- FRIEDRICH, J. *et al.* Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology*, v. 83, n. 11-12, p. 849-871, 2007.
- FUNG, C. *et al.* Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 797-806, 2008.
- GHAJAR, C.; BISSELL, M. J. Tumor Engineering: The Other Face of Tissue Engineering. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, v. 16, n. 7, p. 2153-2156, 2010.
- HALL, H. G. *et al.* Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 79, n. 15, p. 4672-4676, August 1, 1982 1982.
- HALPERN, B. *et al.* Differences in Patterns of Aggregation of Malignant and Non-Malignant Mammalian Cells. *Nature*, v. 209, n. 5019, p. 157-159, 1966.
- HAN, J. *et al.* Molecular Predictors of 3D Morphogenesis by Breast Cancer Cell Lines in 3D Culture. *PLoS Comput Biol*, v. 6, n. 2, p. e1000684, 2010.
- HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Anatomical Record*, v. 1, p. 116-118, 1907.

- HIRSCHHAEUSER, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, v. 148, n. 1, p. 3-15, 2010.
- HOLTFRETER, J. A study of the mechanics of gastrulation. *Journal of Experimental Zoology*, v. 95, n. 2, p. 171-212, 1944.
- HOLTFRETER, J. Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis. *Journal of Experimental Zoology*, v. 106, n. 2, p. 197-222, 1947.
- INCH, W. *et al.* Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth*, v. 34, p. 271-282, 1970.
- INGBER, D. E. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 97, n. 2-3, p. 163-179, 2008.
- INGRAM, M. *et al.* Tissue engineered tumor models. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 85, n. 4, p. 213-229, 2010.
- INMAN, J.; BISSELL, M. Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? *Journal of Biology*, v. 9, n. 1, p. 2, 2010.
- IVASCU, A.; KUBBIES, M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, v. 31, p. 1403-1413, 2007.
- JAASKELAINEN, J. *et al.* Effect of LAK cells against three-dimensional tumor tissue. In vitro study using multi-cellular human glioma spheroids as targets. *The Journal of Immunology*, v. 142, n. 3, p. 1036-1045, February 1, 1989 1989.
- 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.
- KERR, D. J. *et al.* Cytotoxic drug penetration studies in multicellular tumour spheroids. *Xenobiotica*, v. 18, n. 6, p. 641-648, 1988.
- KESHISHIAN, H. Ross Harrison's "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement". *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, v. 301A, n. 3, p. 201-203, 2004.
- KIM, J. B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, v. 15, n. 5, p. 365-377, 2005.
- KIM, S. H. J. *et al.* Computational investigation of epithelial cell dynamic phenotype in vitro. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, v. 6, n. 8, 2009.
- KIRSHNER, J. *et al.* CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 521-526, 2003.
- KRAUSE, S. *et al.* The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures. *BMC Cancer*, v. 10, n. 263, 2010.
- KUNZ-SCHUGHART, L. A. *et al.* The use of 3D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J. Biomol. Screen.*, v. 9, p. 273-284, 2004.
- KUNZ-SCHUGHART, L. A. *et al.* Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 79, n. 1, p. 1-23, 1998.

- LEIGHTON, J. A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cell in vitro. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 12, p. 545-561, 1951.
- LEIGHTON, J. The growth patterns of some transplantable animal tumors in sponge matrix tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 15, p. 275-293, 1954.
- LEVINE, B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature*, v. 446, p. 745-747, 2007.
- LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.
- LIN, R.-Z.; CHANG, H.-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, v. 3, n. 9-10, p. 1172-1184, 2008.
- MAIURI, M. C. *et al.* Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ*, v. 16, n. 1, p. 87-93, 2008.
- MAZZOLENI, G. *et al.* Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research? *Genes & Nutrition*, v. 4, n. 1, p. 13-22, 2009.
- MCALLISTER, R. M. *et al.* Colonial growth in agar of cells derived from adenovirus-induced hamster tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 39, p. 43-53, 1967.
- MILLER, B. E. *et al.* Factors Affecting Growth and Drug Sensitivity of Mouse Mammary Tumor Lines in Collagen Gel Cultures. *Cancer Research*, v. 45, n. 9, p. 4200-4205, September 1, 1985 1985.
- MILLS, K. R. *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 10, p. 3438-3443, March 9, 2004 2004.
- MILLS, K. R. *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 101, p. 3438-3443, 2004.
- MORALES, J.; ALPAUGH, M. Gain in cellular organization of inflammatory breast cancer: A 3D in vitro model that mimics the in vivo metastasis. *BMC Cancer*, v. 9, n. 1, p. 462, 2009.
- MOSCONA, A. THE DEVELOPMENT IN VITRO OF CHIMERIC AGGREGATES OF DISSOCIATED EMBRYONIC CHICK AND MOUSE CELLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 43, n. 1, p. 184-194, January 15, 1957 1957.
- MUELLER-KLIESER, W. Multicellular spheroids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 113, n. 2, p. 101-122, 1987.
- MUELLER-KLIESER, W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical reviews in oncology/hematology*, v. 36, n. 2, p. 123-139, 2000.
- PETERSEN, O. W. *et al.* Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 9064-9068, 1992.

- PIETRAS, K.; ÖSTMAN, A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, v. 316, n. 8, p. 1324-1331, 2010.
- RANGARAJAN, A. *et al.* Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, v. 6, n. 2, p. 171-183, 2004.
- SCHAEFFER, W. I. In memorium -- a tribute to Dr. Joseph Leighton. *Methods in Cell Science*, v. 21, n. 1, p. 1-4, 1999.
- SCHMEICHEL, K.; BISSELL, M. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci*, v. 116, n. Pt 12, p. 2377 - 2388, 2003.
- SIEMANN, D. W.; SUTHERLAND, R. M. The Interaction between Adriamycin and Radiation in a Solid Murine Tumor. *Radiation Research*, v. 83, n. 2, p. 345-359, 1980.
- SOULE, H. D. *et al.* Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Research*, v. 50, n. 18, p. 6075-6086, September 15, 1990 1990.
- SOULE, H. D. *et al.* A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 51, n. 3, p. 1409-1416, 1973.
- SPENCER, V. *et al.* Gene Expression in the Third Dimension: The ECM-nucleus Connection. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 15, n. 1, p. 65-71, 2010.
- STEEG, P. S. *et al.* An Added Dimension: Will Three-Dimensional Cultures Improve Our Understanding of Drug Resistance? *Journal of the National Cancer Institute*, v. 86, n. 13, p. 953-955, July 6, 1994 1994.
- STEPHANIE, H. *et al.* 3D cell cultures of human head and neck squamous cell carcinoma cells are radiosensitized by the focal adhesion kinase inhibitor TAE226. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, v. 92, n. 3, p. 371-378, 2009.
- STEPHANIE, H. *et al.* Caveolin-1 mediated radioresistance of 3D grown pancreatic cancer cells. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, v. 92, n. 3, p. 362-370, 2009.
- STORCH, K. *et al.* Three-Dimensional Cell Growth Confers Radioresistance by Chromatin Density Modification. *Cancer Research*, v. 70, n. 10, p. 3925-3934, May 15, 2010 2010.
- SUTHERLAND, R.; DURAND, R. Radiosensitization by nifuroxime of the hypoxic cells in an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology*, v. 22, p. 613-618, 1972.
- SUTHERLAND, R. M. *et al.* Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, v. 5, n. 8, p. 1225-1230, 1979.
- SUTHERLAND, R. M. *et al.* A multicomponent radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology*, v. 18, n. 491-495, 1970.
- SUTHERLAND, R. M. *et al.* Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl Cancer Inst.*, v. 46, p. 113-120, 1971.

- UNDERWOOD, J. M. *et al.* The ultrastructure of MCF-10A acini. *Journal of Cellular Physiology*, v. 208, n. 1, p. 141-148, 2006.
- WEAVER, V. *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*, v. 137, p. 231 - 245, 1997.
- WINZLER, R. J. Carbohydrates in Cell Surfaces. In: G.H. BOURNE, J. F. D.; JEON, K. W. (Ed.). *International Review of Cytology*: Academic Press, 1970. p. 77-125.
- WITKOWSKI, J. A. Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture. *Medical History*, v. 23, p. 279-296, 1979.
- YANG, J. *et al.* Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, n. 7, p. 3401-3405, 1979.



Naturalia – eISSN:2177-0727 - ISSN: 0101-1944 - UNESP, Rio Claro, SP, Brasil
Licenciada sob [Licença Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)