

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

LEONARDO FRANCISCO DIEL

DESENVOLVIMENTO DE MUCOSA ORAL *IN VITRO*.

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

LEONARDO FRANCISCO DIEL

DESENVOLVIMENTO DE MUCOSA ORAL *IN VITRO*.

Linha de pesquisa: Câncer Bucal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Diel, Leonardo Francisco
Desenvolvimento de Mucosa Oral In vitro / Leonardo
Francisco Diel. -- 2023.
75 f.
Orientador: Marcelo Lazzaron Lamers.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2023.

1. cultivo de células . 2. bioengenharia . I.
Lamers, Marcelo Lazzaron, orient. II. Título.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus avós Zulmira e Ignácio (*in memoriam*), a minha mãe Neuci e a minha tia Neusa, por toda a torcida e apoio incondicional.

Agradecimentos

As forças do universo, que recebem vários nomes e que eu costumo chamar de Deus.

A toda minha família.

À Luiza por todo o apoio e parceria em todos estes anos.

Ao meu orientador pela confiança no meu trabalho e orientações.

À Lisiane Bernardi por todas as horas de conversa e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Migração Celular - LAMOC, que ao longo deste tempo contribuíram de alguma forma para meu crescimento como pesquisador e pessoa.

À Bibiana Matte e Nucleo in vitro pela possibilidade de vivenciar outra experiência no doutorado sanduiche empresarial.

Aos meus amigos Cleuton Rolim e Fernando Cassel.

Aos professores da Faculdade de Odontologia e do Programa de Pós Graduação, que foram importantes em minha formação. Em especial aos professores da Patologia.

Aos técnicos Mariana Mena Barreto, Maikel Rosa Oliveira e Juciana Clarice Cazarolli.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFRGS, pelo acesso e utilização de sua infraestrutura.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS.

À CAPES e o CNPq pelas bolsas de fomento.

“Numa folha qualquer
Eu desenho um sol amarelo (que descolorirá)
E com cinco ou seis retas
É fácil fazer um castelo (que descolorirá)
Giro um simples compasso
E num círculo eu faço o mundo (que descolorirá)

Toquinho

RESUMO

O cultivo celular permitiu diversos avanços na forma como vemos os processos que regem o funcionamento dos organismos vivos. A cultura em ambiente 2D utilizando células primárias ou linhagens imortalizadas trouxe luz a diversos questionamentos em relação: à morfologia celular; aos processos bioquímicos e metabólicos; à expressão gênica e proteica; ao estudo do comportamento celular; ao desenvolvimento de doenças; e ao desenvolvimento e teste de milhares de fármacos. Com a evolução das ferramentas de análise, lacunas quanto ao modelo 2D surgiram, principalmente relacionadas à interação célula a célula na monocamada, o que leva a alterações nas funções celulares não mimetizando o que se observa *in vivo*. Sendo assim modelos de cultivo 3D surgiram em uma tentativa de recriar um ambiente fisiologicamente e metabolicamente mais semelhante ao encontrado nos tecidos e órgãos. Como exemplos temos a técnica de esferoides, as culturas organotípicas, os organoides e modelos de microfluídica, que buscam tornar o modelo mais complexo com a incorporação de hidrogéis e elementos da matriz extracelular. Um dos hidrogéis mais utilizado para cultura 3D é o colágeno, que possui alta biocompatibilidade além de possuir propriedades biomiméticas. Outro ponto que ainda é um grande desafio é o desenvolvimento formas de mimetizar um sistema de circulação capaz de realizar a perfusão do meio de cultura na matriz. O objetivo desta tese foi aprimorar um modelo de mucosa utilizando diferentes fontes de colágeno e elementos da matriz extracelular e desenvolver metodologias de circulação de meio de cultura. Foi realizada uma análise comparativa entre o colágeno extraído da cauda do rato e do tendão de pé de suíno, com ação de fibroblastos primários e fibronectina e laminina ao gel de colágeno mimetizando a camada dérmica da mucosa e adição de queratinócitos (HaCaT) sobre formando o epitélio. Observamos que o uso de colágeno suíno resultou em um modelo com epitélio menos permeável suportado por uma matriz mais porosa e maior atividade de fibroblastos. A adição de componentes da MEC levou a um epitélio mais espesso e maduro e aumentou a atividade dos fibroblastos. O uso de colágeno suíno mostrou-se eficiente, e a adição de componentes da MEC potencializou o modelo de mucosa. Desenvolvemos uma patente que propõe uma estratégia para perfusão e recirculação do meio de cultura. A incorporação de outros elementos da matriz extracelular tornou o modelo de mucosa mais robusto, complexo podendo ser uma ferramenta útil no teste de fármacos.

Palavras chave: cultura 2D, cultura 3D, cultura organotípica, mucosa, colágeno, matriz extracelular.

ABSTRACT

Cell culture has allowed various advancements in how we perceive the processes governing the functioning of living organisms. 2D culture using primary cells or immortalized cell lines has shed light on various inquiries regarding cellular morphology, biochemical and metabolic processes, gene and protein expression, the study of cellular behavior, disease development, and the testing of thousands of drugs. As analytical tools evolved, gaps in the 2D model emerged, particularly concerning cell-to-cell interaction in the monolayer, leading to changes in cellular functions that do not mimic what is observed in vivo. Therefore, 3D culture models emerged in an attempt to recreate a physiologically and metabolically more similar environment to that found in tissues and organs. Examples include spheroid techniques, organotypic cultures, organoids, and microfluidic models, aiming to make the model more complex by incorporating hydrogels and elements of the extracellular matrix. One of the most commonly used hydrogels for 3D culture is collagen, which has high biocompatibility and biomimetic properties. Another challenge is the development of ways to mimic a circulation system capable of perfusing the culture medium into the matrix. The goal of this thesis was to improve a mucosa model using different sources of collagen and extracellular matrix elements and develop methodologies for medium circulation. A comparative analysis was conducted between collagen extracted from the rat tail and pig's foot tendon, with the action of primary fibroblasts and fibronectin and laminin on the collagen gel mimicking the dermal layer of the mucosa, and the addition of keratinocytes (HaCaT) forming the epithelium. We observed that the use of pig collagen resulted in a model with a less permeable epithelium supported by a more porous matrix and higher fibroblast activity. The addition of ECM components led to a thicker and more mature epithelium and increased fibroblast activity. The use of pig collagen proved to be efficient, and the addition of ECM components enhanced the mucosa model. We developed a patent proposing a strategy for perfusion and recirculation of the culture medium. The incorporation of other extracellular matrix elements made the mucosa model more robust and complex, potentially serving as a useful tool in drug testing.

Keywords: 2D culture, 3D culture, organotypic, mucosa, collagen, extracellular matrix.

Lista de Abreviações

µm - micrômetro

DMEM – meio de Eagle Modificado por Dulbecco

EM – meio essencial

FN – fibronectina

GACs – glicosaminoglicanos

HaCaT – linhagem celular de queratinócito

HE – hematoxilina/eosina

LM – laminina

MEC/ECM – matriz extracelular

mM – mili molar

NaCl – cloreto de sódio

PCL – policaprolactona

PGA – poli (ácido-glicólico)

PGs – proteoglicanos

pH – potencial hidrogeniônico

PLA – poli (ácido-láctico)

PLGA – poli (ácido láctico co-glicólico)

RT-qPCR – reação da polimerase reversa em tempo real

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
	1.1 A evolução do cultivo celular	12
	1.2 Técnicas 2D de cultivo celular	13
	1.3 Técnicas de cultivo 3D	14
	1.3.1 Técnica do esferóide	15
	1.3.2 Culturas organotípicas.....	16
	1.4 Estrutura da pele/mucosa.....	18
	1.5 Matriz Extracelular.....	21
	1.6 Aplicações dos modelos 3D	24
	1.7 Desafios para o método de cultura 3D	25
2.	HIPÓTESE	30
3	OBJETIVOS	31
	3.1 Objetivo Geral	31
	3.2 Objetivos Específicos.....	31
4.	RESULTADOS	30
	4.1. Artigo 1	30
	4.2. Patente	52
5.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	65
6.	PERSPECTIVAS.....	69
7.	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 A evolução do cultivo celular

O cultivo de células teve início em 1907 com Harrison e seu estudo com fibras nervosas de embriões de sapos mantidas em linfa de sapos adultos, (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Carrel e Burrows cultivaram fragmentos de tecidos de vários animais e também tumores, utilizando o plasma do animal de origem, que mais tarde foi substituído pelo soro do animal de origem. Foi Carrel quem desenvolveu o primeiro frasco de cultura de vidro que levaram o nome de frasco D. Adicionalmente, percebeu que havia a necessidade de se utilizar técnicas estéreis no cultivo bem como o uso de substância antibacterianas e para isso testou o uso de pequenas quantidades de tolueno para deter o crescimento bacteriano (Taylor, 2014).

Em 1948, Earle estabeleceu a primeira linhagem celular, um fibroblasto derivado de tecido subcutâneo de camundongo que recebeu o nome de célula L (L929). Em 1952, Gay estabelece a primeira linhagem humana imortalizada, derivada de um adenocarcinoma agressivo do colo do útero denominada de HeLa. Outro fator importante no cultivo celular é a manutenção destas em meios líquidos que proporcionassem as condições para estas células se desenvolverem fora do organismo vivo, uso de plasma ou linfa animal levava a grande variedade de composição química e contaminação da cultura. Diversos pesquisadores começaram a estudar os componentes mais necessários ao metabolismo celular, como aminoácidos, sais, vitaminas, hormônios e glicose e o destaque fica com meio essencial EM e o DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, também foram desenvolvidos com aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo atualmente um meio muito usado na cultura celular (Magdalena, 2017).

Estas descobertas iniciais possibilitaram que diversas outras linhagens fossem estabelecidas utilizando tecidos animais e humanos normais ou patológicos, com no caso das linhagens tumorais. Estas linhagens são usadas em diferentes ensaios, como avaliações morfológicas, compreensão do comportamento celular, estudos de processo bioquímicos, metabólicos,

identificação de genes e proteína, teste de novos fármacos, entre outros (Sanyal, 2014).

1.2 Técnicas 2D de cultivo celular

O cultivo celular clássico é realizado em ambiente bi-dimensional (2D) utilizando linhagens celulares ou culturas primárias cultivadas em garrafas ou placas, nas quais as células ficam aderidas ao fundo ou dispersas no meio. Diversos dispositivos de cultivo e ensaios metodológicos foram criados visando otimizar o cultivo utilizando a cultura 2D. De uma maneira geral, no cultivo 2D as células aderentes são semeadas em superfícies planas, (placas ou garrafas) juntamente com meio de cultura e crescem em monocamada (figura1). O meio é um componente fundamental, pois vai fornecer os componentes essenciais para o desenvolvimento e proliferação das células. Sua composição varia de acordo com a linhagem, mas basicamente contém glicose, sais minerais e aminoácidos, podendo ser suplementado com soro fetal de diferentes animais, sendo o mais comum o de origem bovina que vai fornecer fatores de crescimento e proteínas importantes para as células (Yao and Asayama, 2017).

A cultura 2D tem suas vantagens sendo uma técnica de fácil desenvolvimento, manutenção e custo relativamente baixo. Uma grande quantidade de ensaios foi padronizada utilizando essa técnica, sendo que os insumos para cultivo (placas e garrafas) e formas de análise foram desenvolvidos baseadas neste modelo (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

Avanços na compreensão dos diferentes mecanismos gênicos e moleculares das células evidenciaram que o ambiente 2D não pode não mimetizar as características metabólicas e fisiológicas e a complexidade estrutural dos tecidos vivos. No caso de cultura de células aderentes, observa-se a formação de uma monocamada no fundo da placa o que causa uma interação célula-célula e célula ambiente diferente de um tecido normal ou de uma massa tumoral. As interações celulares se relacionam a diversos processos como: diferenciação celular, proliferação, vitalidade, expressão de genes e proteínas, capacidade de resposta a estímulos, metabolismo de drogas (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

Algumas desvantagens são observadas no ambiente de cultivo 2D. Por exemplo, as células em monocamada têm um acesso homogêneo ao meio de cultura, a nutrientes, metabólitos e moléculas sinalizadoras e também a fatores físicos como a concentração de oxigênio e gás carbônico. Não existe também uma interação adequada das células com a matriz extracelular (Kapalczyńska *et al.*, 2018; Jensen and Teng, 2020). Quando submetidas a ensaios, como teste de fármacos, o contato uniforme com a droga pode levar a uma potencialização dos efeitos destas, o que leva a insucessos na transposição dos testes *in vitro* para o *in vivo* (Mehrotra *et al.*, 2010). Em suma, nas culturas 2D falta a dimensão de volume que permita interações mais complexas entre as células e destas com seu ambiente, e mimetize de uma forma mais fidedigna os processos celulares, necessitando de ajustes técnicos para ensaios mais fiéis ao funcionamento *in vivo*.

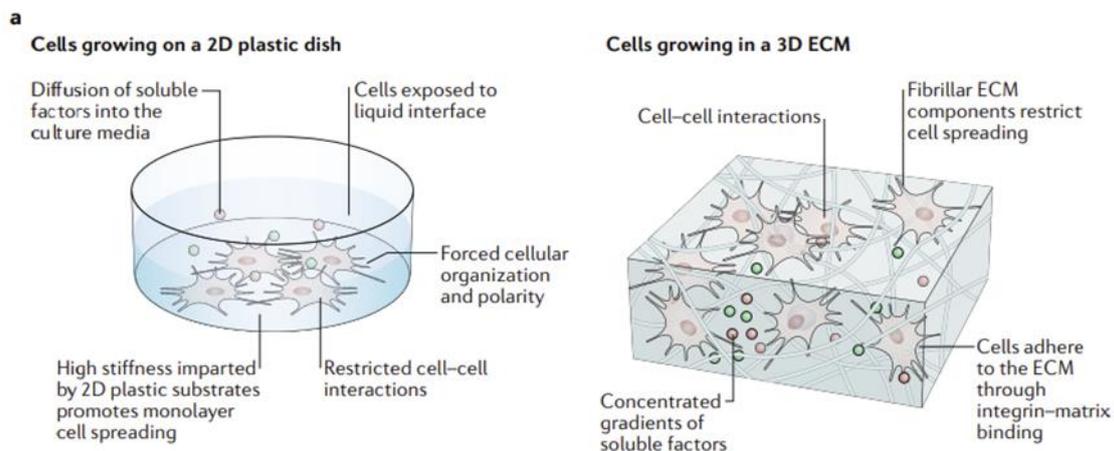


Figura 1: ilustração demonstrando A) técnica de cultivo tradicional 2D, onde as células aderentes dispostas em monocamada no fundo da placa de cultura; e B) modelo de cultivo 3D onde, as células embebidas em uma matriz, ocorre a maior interação célula a célula e com os componentes da matriz. Adaptado de (Hussey *et al.*, 2018).

1.3 Técnicas de cultivo 3D

O emprego de técnicas 3D de cultivo celular surge como uma alternativa para desenvolver um modelo mais complexo, que mimetize as condições fisiológicas e preencha as lacunas entre a cultura celular e os ensaios em

animais. Estas técnicas podem ser divididas em dois tipos: os esferoides e as culturas 3D (organotípicas, organoides) (Gunti *et al.*, 2021)

1.3.1 Técnica do esferóide

A técnica do esferoide foi estabelecida pela primeira vez em 1971, usando células pulmonares V79 de hamster chinês. Esta técnica utiliza placas não aderentes que permitem que as células em suspensão formem agregados celulares esféricos (Kim *et al.*, 2023). As células que formam este agregado secretam matriz extracelular que permite a ligação das integrinas que contribuem para a adesão célula a célula e com o passar dos dias ocorre uma regulação positiva de E-caderina fortalecendo estas ligações o que torna a esfera mais compacta (Smyrek *et al.*, 2019).

Entre as vantagens dos esferoides: 1 - a facilidade de realização do protocolo; 2 - não há a necessidade e uso de um andaime ou matriz de sustentação; 3 - menor custo entre as técnicas 3D; 4 - uma maior interação célula a célula; 5 - cria-se um relação de borda e centro; 6 - diferentes gradientes de dispersão de oxigênio e fatores solúveis; 7 - criação de populações heterogêneas (por exemplo, células hipóxicas vs. normóxicas, quiescentes vs. células em replicação); 8 - modelo bem estabelecido para a avaliação do efeito de drogas antitumorais, já que no tumor também se apresenta com uma forma maciça de células onde ocorre esse gradiente borda/centro e células em diferentes estágios metabólicos (Fang and Eglen, 2017; Carvalho *et al.*, 2022).

As desvantagens desta técnica são: 1 - dificuldade de formar esferoides homogêneos principalmente em linhagens tumorais mais invasivas com fenótipo mais mesenquimal em que existe uma diminuição da E-caderina; 2 - uso de diferentes tipos celulares e a disposição das células ocorre de forma aleatória; 3 - a interação com outros componentes de matriz extracelular ainda é limitada; 4 - o tamanho da esfera, visto que esferas grandes apresentam um centro necrótico (Vinci *et al.*, 2012; Białkowska *et al.*, 2020).

1.3.2 Culturas organotípicas

As culturas organotípicas e organóides utilizam andaime (tradução de *scaffold*) como base de sustentação para as células possibilitando a construção de um “tecido” com camadas definidas e uma matriz extracelular. Estes andaimes fornecem suporte físico às células, permitindo-lhes agregar, proliferar e migrar, estes buscam imitar a matriz extracelular do tecido; fornecendo um substrato para as células interagirem (Temple *et al.*, 2022).

Os materiais utilizados para a fabricação de andaimes devem ser biocompatíveis permitindo o bioreconhecimento molecular das células. As propriedades mecânicas do material e a degradação cinética devem ser levados em conta de acordo com o tipo de tecido que se queira produzir. A distribuição dos poros, a área superficial exposta e a porosidade desempenham um papel importante, influenciando a penetração dentro do volume da estrutura (Carletti *et al.*, 2011). Para a confecção dos andaimes pode-se utilizar hidrogéis sintéticos ou naturais figura 2.

Os hidrogéis sintéticos podem ser mais facilmente adaptados as necessidades específicas do tecido produzidos, suas propriedades mecânicas são ajustáveis o que permite uma maior estabilidade e reprodutibilidade da estrutura e controle do tamanho dos poros e da rigidez, porém são menos biocompatíveis e bioativos. Os polímeros sintéticos mais usados são: poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), ou seus copolímeros ou misturas, bem como o poliéster alifático policaprolactona (PCL) (Carletti *et al.*, 2011).

Os hidrogéis naturais como colágeno, ácido hialurônico, quitosana, alginato são extraídos de plantas ou animais e apresentam biocompatibilidade e baixa toxicidade. A variabilidade entre lotes a obtenção e o processamento é mais complexo, o que torna seu custo mais elevado, além disso o tamanho da trama reticulada e dos poros não é homogêneo (Maji and Lee, 2022).

Os hidrogéis de colágeno são muito utilizados nos ensaios 3D por suas propriedades biomiméticas: citocompatibilidade, adesão celular e por formar um ambiente viscoelástico em que as células conseguem se manter e desenvolver. O colágeno utilizado nos hidrogéis é predominantemente o do tipo

1, derivado do tendão da cauda de rato. O processo de automontagem das fibrilas de colágeno e a geleificação ocorre quando elevamos a temperatura e o pH do colágeno. O tamanho das fibras formadas tem influência no comportamento celular, por exemplo em fibrilas maiores os fibroblastos apresentam menor alongamento e maior velocidade de migração (Caliari and Burdick, 2016). A este hidrogel podem ser adicionados outros componentes da matriz extracelular como proteínas, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (fibronectina, laminina, ácido hialurônico), tornando o ambiente mais complexo e auxiliando na interação das células a matriz.

Hydrogel	Type	Advantages	Disadvantages
Agarose	Natural	High mechanical strength, low cost	Low cell adhesion
Alginate	Natural	Fast gelation, low cost, good stability	Poor cell attachment, easily clogs at high concentrations
Chitosan	Natural	Antibacterial & antifungal	Slow gelation, poor mechanical properties
Collagen I	Natural	Promotes cell attachment, good printing abilities, have RGD sequence ^a	Poor mechanical stability, slow gelation, easily clogs
Fibrin	Natural	Promotes angiogenesis, fast gelation	Poor mechanical stability, easily clogs
Gelatin	Natural	Reversible, promotes cell adhesion	Unstable/fragile, poor abilities without modification
Hyaluronic acid (HA)	Natural	Promotes proliferation and angiogenesis, fast gelation	Rapid degradation, poor mechanical stability
Matrigel	Natural	Promotes differentiation	Clogs easily, made from tumor cells
Methacrylated gelatin/ gelatin methacryloyl (GelMA)	Synthetic	Easily degradable, high mechanical strength	Slow gelation, requires ultraviolet (UV) light which causes cell damage
Pluronic	Synthetic	Reversible (good sacrificial ink)	Poor mechanical stability, rapid degradation, requires thermal control
Polyethylene glycol (PEG)	Synthetic	Good when combined with other components	Low cell proliferation & adhesion, poor mechanical strength, UV causes cell damage

Figura 2: vantagens e desvantagens dos hidrogéis naturais e sintéticos mais utilizados nos modelos 3D: Adaptado de: (Leberfinger *et al.*, 2017)

As vantagens em se utilizar o modelo 3D a base de colágeno são: a maior interface célula a célula, a criação de um volume tridimensional que permite uma atuação diferenciada dos fatores físicos (oxigênio e as forças mecânicas que atuam sobre estas células), a possibilidade de criar gradientes de concentração de nutrientes e dispersão de drogas, a interação com outras células como as do sistema imune criando um microambiente celular e uma maior mimetização dos processos fisiológicos (Langhans, 2018). As desvantagens da técnica se relacionam ao tempo e custo para preparo, a necessidade de adaptação e validação de alguns testes.

Diversos modelos que mimetizam tecidos humanos tem sido propostos, pulmão, mama, fígado, intestino, cérebro são alguns exemplos (Clevers, 2016). O modelo de pele equivalente que visa mimetizar a pele humana tem ganhado destaque nos últimos anos, para utilização de testes *in vitro* de cosméticos e medicamentos, e em pesquisa oncológica. A busca pela construção de tecidos mais complexos, com maior número de camadas e células além das estruturas presentes na pele é constante e aprimoramentos nos modelos já existentes são necessários.

1.4 Estrutura da pele/mucosa

Os modelos de pele/mucosa equivalentes buscam reproduzir a morfologia e processos fisiológicos encontrados no ser vivo. A estrutura da pele e seus apêndices são subdivididos em duas camadas: epiderme e derme (figura 3).

Na epiderme observa-se um tecido epitelial estratificado composto por células justapostas que repousam sobre uma membrana basal. Dentre os tipos celulares observa-se a presença de queratinócitos, células de Merkel, células de Langerhans e melanócitos. A epiderme possui quatro estratos: 1- estrato basal, nesta os queratinócitos sofrem constantes divisões celulares para substituir as células que se movem em direção à superfície, entre as células desta camada se encontram os melanócitos que produzem e secretam a melanina; 2- estrato espinhoso com várias camadas de queratinócitos; 3- estrato granuloso composta por três a quatro camadas de queratinócitos

achatados; 4- estrato córneo: camada mais externa formada por células mortas completamente queratinizadas, sua espessura varia de acordo com a região, são estas células que sofrem descamação por causa dos atritos diários (Nahirney and Ovalle, 2014).

A derme é composta por um tecido conjuntivo altamente vascularizado composto por diferentes tipos celulares embebidos em uma matriz extracelular (fibras de colágeno, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas) que participa da modulação das propriedades mecânicas da pele. Adicionalmente, observa-se na derme uma grande variação de anexos da pele, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Apresenta uma camada papilar mais superficial e uma camada reticular profunda. O aporte sanguíneo de nutrientes para a epiderme é realizado através de uma rede de capilares encontrados na camada papilar em íntimo contato com o estrato basal do epitélio (Ross and Pawlina, 1979; Arda *et al.*, 2014; Nahirney and Ovalle, 2014).

A composição e estrutura da epiderme e da derme varia de acordo com as características da região que está sendo revestida. Por exemplo, a espessura da epiderme varia de 0,5mm (pele fina) a 3,0mm (pele grossa). Adicionalmente, na face observa-se uma grande variação na composição da derme, especialmente dos seus anexos (Arda *et al.*, 2014).

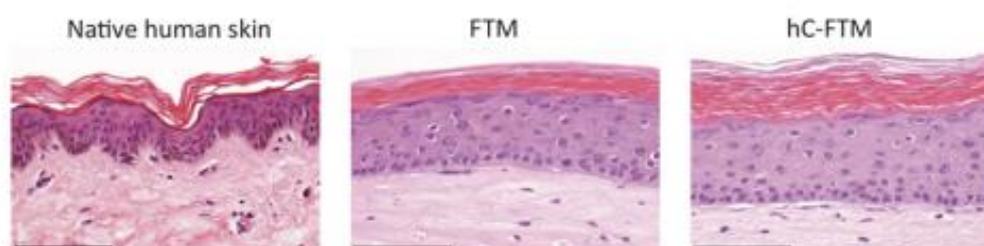


Figura 3: imagem histológica corada em HE de uma pele humana; FTM um modelo 3D utilizando colágeno extraído de cauda de rato; e hC-FTM um modelo com colágeno humano. Adaptado de: (Mieremet *et al.*, 2018).

A mucosa é formada por um conjunto de tecido que reveste os órgãos e cavidades do corpo, mantendo estes úmidos e protegendo contra partículas e agentes agressores. No estômago e na bexiga, protege dos efeitos abrasivos

do ácido estomacal e da urina. Na cavidade nasal tem função de captar as partículas olfativas. Histologicamente é dividida em 3 camadas: epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa.

O epitélio possui uma alta taxa de renovação celular e pode ser estratificado, cúbico ou pseudoestratificado, possuir estruturas acessórias como cílios e microvilosidades, e estruturas secretoras de muco, que vai recobrir a superfície deste epitélio. O tipo de epitélio e das estruturas varia de acordo com as necessidades do órgão.

A lâmina própria situada abaixo do epitélio se caracteriza por um tecido conjuntivo frouxo onde se encontram os fibroblastos que produzem proteínas estruturais, glicoproteínas e proteoglicanos, que vão fazer a sustentação e união dos componentes este tecido conjuntivo. Nesta ainda se localizam os vasos sanguíneos que irrigarão o epitélio e nervos. Encontramos ainda células do sistema do sistema imune que atuam na vigilância e defesa contra invasores.

A muscular da mucosa é a camada mais profunda contendo músculo liso e sua espessura varia de órgão para órgão. A presença de músculo liso faz com que a mucosa se movimente ativamente esticando e contraindo movendo o muco e atuando nos movimentos da autolimpeza.

A camada de revestimento que cobre as estruturas na cavidade oral é chamada de mucosa oral. Essa membrana, constituída por tecido mole úmido, estende-se desde a junção entre a borda vermelha dos lábios e a mucosa labial, na parte anterior, até as pregas palatofaríngeas, na parte posterior.

Do ponto de vista histológico, a mucosa oral também é composta por três camadas. A camada mais externa é um epitélio escamoso estratificado superficial, conhecido como epitélio oral. A espessura e o grau de queratinização dessa camada dependem da localização e das demandas funcionais. Logo abaixo encontra-se a lâmina própria, e mais profundamente, um tecido conjuntivo denso e irregular denominado submucosa. Em algumas áreas da cavidade oral, a submucosa está ausente, e a lâmina própria está diretamente ligada ao osso ou músculo. A mucosa oral pode ser classificada

em três tipos: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada, cada uma com características histológicas, clínicas e funcionais distintas. Suas diversas funções incluem principalmente a proteção dos tecidos subjacentes contra estímulos mecânicos, químicos e biológicos, a secreção de substâncias essenciais e uma função sensorial que possibilita a percepção de temperatura, tato, dor e paladar.

1.5 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) fornece uma estrutura de suporte mecânico para células e tecidos sendo composta por uma rede complexa de proteínas estruturais e funcionais nas quais as células conseguem se ancorar, fatores de crescimento e moléculas ativas, estabelecendo gradientes de concentração e regulando espacial e temporalmente sua biodisponibilidade. Está diretamente envolvida nas funções celulares como proliferação, adesão, migração, polaridade, diferenciação e apoptose (Yue, 2014).

A MEC sofre constantemente remodelação, seus componentes são depositados, degradados ou modificados. Os principais componentes da MEC são colágenos, proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs), elastina e fibras elásticas, lamininas (LM), fibronectina (FN) e outras proteínas glicoproteínas, como proteínas matricelulares (figura 6) (Karamanos *et al.*, 2021). Modelos baseados em MEC têm sido usados em uma ampla variedade de abordagens de engenharia de tecidos e medicina regenerativa para reconstrução funcional de tecidos (Brown and Badylak, 2016).

O colágeno é a proteína mais presente na matriz extracelular. Mais de 30%, das MEC é formada por colágeno tipo I, II e III, que constituem 80-90% do colágeno corporal total, proporciona resistência as tensões sofridas pelo tecido conjuntivo, e atua nos processos celulares, como adesão e migração. Matrizes de colágeno tipo I têm sido amplamente utilizadas como modelo de laboratório para MEC, bem como modelos físicos de redes poliméricas semiflexíveis (Kular *et al.*, 2014; Sun, 2021).

A formação da fibra de colágeno envolve várias etapas (figura5). Em um primeiro momento três cadeias polipeptídicas se enrolam em uma hélice

tripla formando o tropocolágeno que se agrupam em protofibrilas, incluindo microfibrilas e subfibrilas e por fim as estas agrupam-se ainda mais em uma fibrila de colágeno, que pode ter até 1µm e centenas de nanômetros de diâmetro. As condições ambientais, como concentração de proteínas, valor de pH ou temperatura possuem influência no processo formando fibras de colágeno de comprimentos e diâmetros variáveis. Uma matriz de colágeno pode ser definida como um conjunto desordenado de fibras de colágeno (Jones *et al.*, 2014; Sun, 2021).

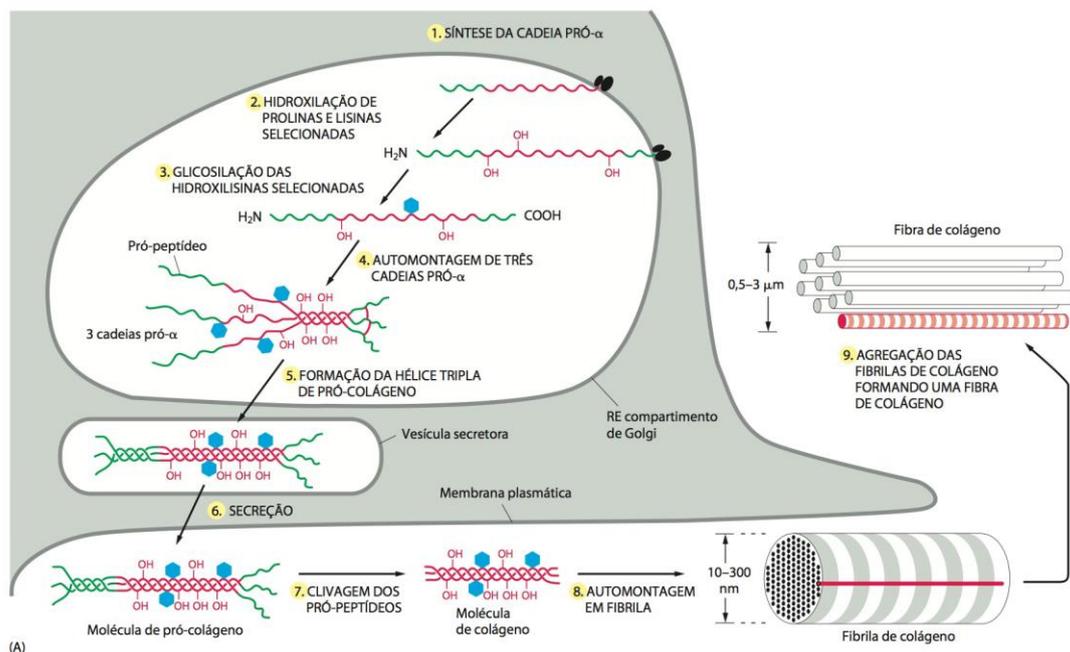


Figura 4: imagem mostrando as etapas intra celulares que ocorrem no retículo endoplasmático e no citoplasma e vão determinar a formação da tripla hélice de pró colágeno (1-5) que é secretado para o exterior da célula (6), onde ocorrem as etapas extracelular resultando na formação da fibra de colágeno (7-9). Adaptada de: (Alberts *et al.*, 2015)

Outro componente da MEC, as proteoglicanas são moléculas complexas, compostos por um núcleo proteico que se ligam a pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAGs), os proteoglicanos são componentes

integrals MEC. Atuam na manutenção da hidratação, resiliência e propriedades de absorção de choque dos tecidos submetidos ao estresse mecânico, tem a capacidade de reter água formando uma matriz viscosa que preenche o espaço, e possuem ainda a capacidade de modular o comportamento das células ligando-se a fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras, que desempenham um papel em vários processos de desenvolvimento e regenerativos (Mouw *et al.*, 2014). Os proteoglicanos são classificados de acordo com a GAGs que se liga a ele, alguns exemplos são proteoglicanos de: sulfato de heparan; sulfato de condroitina; dermatan sulfato; sulfato de queratan; versican, agracan. Cada tipo possui estrutura e função específicas, contribuindo para a saúde e funcionalidade de diferentes tecidos e órgãos (Frantz *et al.*, 2010).

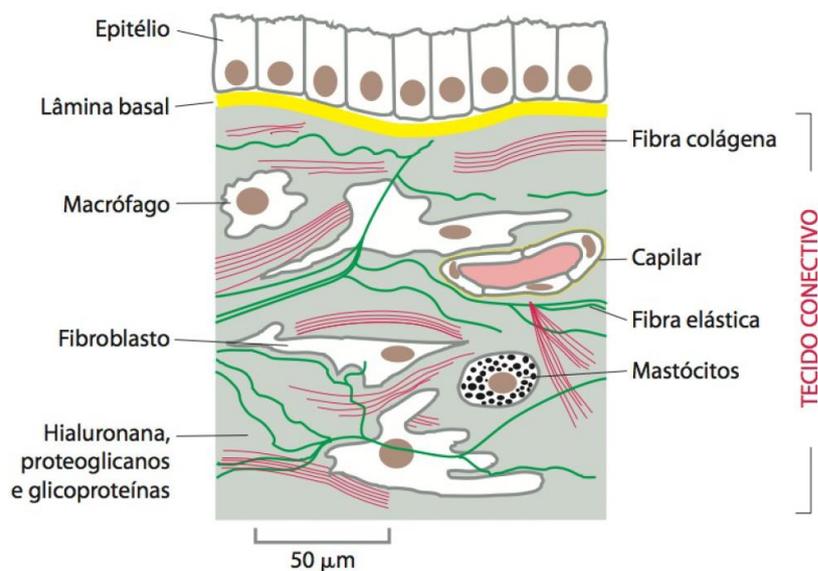


Figura 5: mostrando os principais componentes da matriz extracelular: fibras colágenas, fibras elásticas e as proteoglicanas e glicoproteínas . Adaptado de: (Alberts *et al.*, 2015)

A fibronectina (FN) é considerada uma proteína adesiva de alto peso molecular secretada pelos fibroblastos, apresenta uma sequência RGD (arginina, glicina e aspartato) atuando na adesão a superfície celular e se ligando com outras moléculas da MEC. A FN desempenha um papel na orientação e na migração celular durante o desenvolvimento embrionário e em

processos patológicos como o câncer, atua ainda nos processos de cicatrização e tem influência na montagem das fibras de colágeno (Mouw *et al.*, 2014; Hoffmann and Smith, 2019).

As lamininas são uma família de glicoproteínas localizadas principalmente na lâmina basal, constituídas por cadeias α , β e γ , onde diferentes isoformas de cadeia se combinam para gerar heterotrímeros distintos. Genomas dos mamíferos codificam cinco cadeias α , quatro cadeias β e três cadeias γ ; apenas 15 dos 60 heterotrímeros possíveis foram confirmados bioquimicamente. Ela interage com diversos atores celulares e da MEC tais como sindecano, nidogênio, colágeno, integrinas, distroglicano e heparina (Guldager Kring Rasmussen and Karsdal, 2016; Hohenester, 2019). Ela atua na interação entre as células do epitélio e os componentes da MEC, possuindo ainda papel na adesão, migração, diferenciação e proliferação celular (Aumailley, 2013).

1.6 Aplicações dos modelos 3D

As culturas 3D incorporam mais elementos em sua construção, o que as tornam mais complexas se comparadas as culturas e monocamadas 2D. Podendo ser empregadas na triagem de novas drogas, nos testes de eficácia e eficiência destas, na compreensão dos processos que levam ao desenvolvimento de patologias e no desenvolvimento de terapias mais personalizadas (Edmondson *et al.*, 2014)

A descoberta de medicamentos ainda é algo que demanda tempo e custos elevados e mais da metade de todos os medicamentos falham nos ensaios clínicos de Fase II e Fase III (Langhans, 2018). Um dos motivos do insucesso é a falha durante a transposição dos ensaios do *in vitro* para o *in vivo*, que na maioria das vezes se baseia em culturas 2D o que acaba por superestimar os efeitos da droga. Existe, portanto, a necessidade de modelos que se assemelhem mais aos processos fisiológicos. Atualmente os modelos 3D têm sido adotadas pelos setores de pesquisa e desenvolvimento farmacêutico, pois imitam os fatores teciduais e são os melhores

representantes dos fenômenos celulares *in vivo* em comparação com os modelos 2D (Badr-Eldin *et al.*, 2022).

Outra aplicação dos modelos 3D é no desenvolvimento de terapias personalizadas principalmente para câncer em que as células exibem uma série de mutações que variam de indivíduo para indivíduo ocasionando uma grande heterogeneidade inter-tumoral (Piraino *et al.*, 2019). Isso faz com que cada vez mais se busquem alternativas que contemplem o perfil genético individual do tumor, em que os modelos 3D são usados para avaliar o efeito de drogas individuais ou combinadas sobre as células cancerígenas (Shiihara and Furukawa, 2022). O cultivo de micro fragmento de biópsia que podem ser envoltos em hidrogéis com adição de outras células do microambiente tumoral se mostra promissor tanto no desenvolvimento de terapias imunes quanto na triagem de combinações terapêuticas mais eficazes (Habanjar *et al.*, 2021; Manduca *et al.*, 2023).

As culturas 3D superam as desvantagens das culturas 2D, como a questão da interação célula a célula, a diferença na expressão de genes, no perfil metabólico e fisiológico em um cultivo em monocamada (Habanjar *et al.*, 2021). Modelos 3D podem melhorar a forma como compreendemos o desenvolvimento de diferentes patologias. A possibilidade de criarmos em laboratório mini órgãos (organóides) e de que estes interajam dentro de sistemas mais complexos e permitam a manipulação dos diferentes atores envolvidos, adicionando ou removendo fatores, silenciando ou super expressando genes ou fazendo edição gênica pode ser uma ferramenta útil para elucidar alguns pontos chave que levam ao estabelecimento de doenças (Papariello and Newell-Litwa, 2020; Karmirian *et al.*, 2023).

1.7 Desafios para o método de cultura 3D

Um ponto a ser solucionado nos modelos 3D é a criação de um sistema que mimetize vasos sanguíneos e permita a criação de um sistema de circulação e difusão do meio de cultura de uma forma mais semelhante ao encontrado *in vivo*. A limitação de nutrientes acaba limitando o tamanho, a escalabilidade e a temporalidade dos modelos 3D. Já a difusão do oxigênio

limita a espessura dos modelos de tecido entre 100 e 200µm pois observa-se hipóxia nas regiões mais profundas de estruturas maiores resultando em parada do crescimento ou morte celular (Anthon and Valente, 2022).

A formação de vasos é um processo complexo que envolve múltiplas etapas e atores. No embrião inicia pela migração de angioblastos, que são precursores das células endoteliais, para diferentes locais formando cordões sólidos de células. Durante a transformação destas estruturas sólidas em vasos, os angioblastos alteram sua morfologia de células cuboides para achatadas e ocorre um rearranjo em suas junções de contato e passam para se concentrar na região mais basal (Zovein *et al.*, 2010). Posteriormente, a ramificação deste vaso ocorre por brotamentos, processo denominado angiogênese, e a presença destes brotos altera o diâmetro do lúmen, sendo importante para formação de vasos de diferentes calibres, como pode ser visto na figura (Xu and Cleaver, 2011). Além das células endoteliais, outros componentes celulares e não celulares estão envolvidos na manutenção da integridade do vaso sanguíneo, entre estes destacam-se: pericitos, células musculares lisas, fibroblastos, e a matriz extracelular, além de diversos fatores de crescimento (Murakami and Simons, 2009; Laschke *et al.*, 2022).

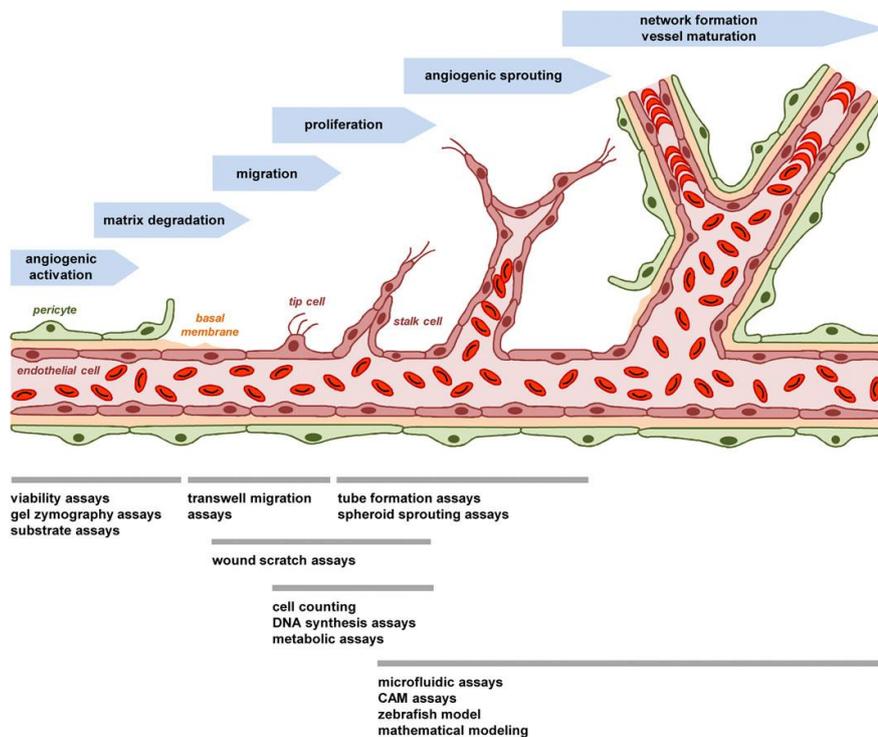


Figura 6: esquema mostrando o processo de angiogênese e as estratégias experimentais para análise. Adaptado de (Laschke *et al.*, 2022).

As estratégias atuais para criar um sistema vascular nos modelos 3D têm se baseado na angiogênese criando estruturas semelhante a tubos, pois não existem métodos precisos de criação de estruturas com capilares com menos de 10 μ m, a adição de fatores angiogênicos, juntamente com fatores de crescimento e proteínas da MEC e células endoteliais é essencial para iniciar a angiogênese e alcançar a vascularização (Hauser *et al.*, 2021; Ze *et al.*, 2022).

Diversas tentativas têm sido realizadas para construção de vasos em modelos 3D, que podem ser divididas em estruturas estáticas, onde há a formação de um tubo que permite uma melhor difusão do meio de cultura, e técnicas em que o meio circule. Entre as técnicas que formam tubos temos: a utilização de esferas de diferentes linhagens celulares e adição de células endoteliais, e adição de fatores angiogênicos, mostrando a formação de tubos semelhantes a vasos ao longo da esfera (Heo *et al.*, 2019; Muller *et al.*, 2019).

Outra ferramenta se baseia no uso da bioimpressão em que o hidrogel carregado com célula é extruído mecanicamente, permitindo a deposição de camadas uniformes e a combinação de técnicas. Han e seu grupo fizeram a bioimpressão de um tubo utilizando células endoteliais e sobre este colocaram uma esfera e observaram a formação de uma rede figura 7 (Han *et al.*, 2020).

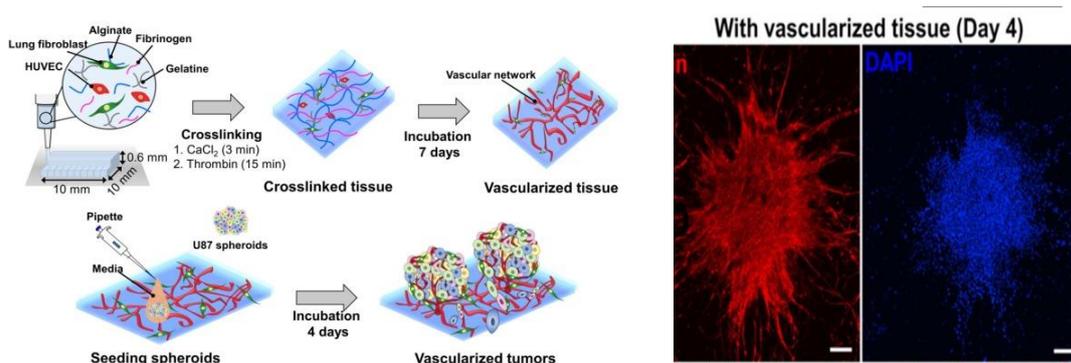


Figura 7: imagem á esquerda representa esquema referente ao modelo onde as células endoteliais HUVEC são colocadas sobre uma matriz e após desenvolver uma rede vascular o esferoide é colocado sobre elas. À direita

imagem em microscópio confocal mostrando a formação dos vasos envolvendo a esfera. Adaptado de: (Han *et al.*, 2020)

Existem ainda os modelos que permitam a circulação contínua do meio de cultura em contato com as células, com destaque para os sistemas baseados em plataformas de microfluídica como a técnica de *organ on a chip*, que utiliza a impressão 3D por litografia para criar um molde com poços e microcanais. Esse molde é copiado em elastômero de silicone onde, as células, esferas ou microfragmentos de tecidos são colocados e o meio é perfundido com auxílio de uma bomba de infusão (Low *et al.*, 2021; Leung *et al.*, 2022) figura 8. Os chips individualizados para o órgão de interesse replicando as características celulares e extracelulares deste que podem responder a sinais bioquímicos e físicos para manter e simular sua função. Por meio do desenho do chip podemos controlar a dinâmica de perfusão que pode ser determinada em quantidades mínimas como picolitros, e ainda coletar esse meio para análises (Hargrove-Grimes *et al.*, 2021)

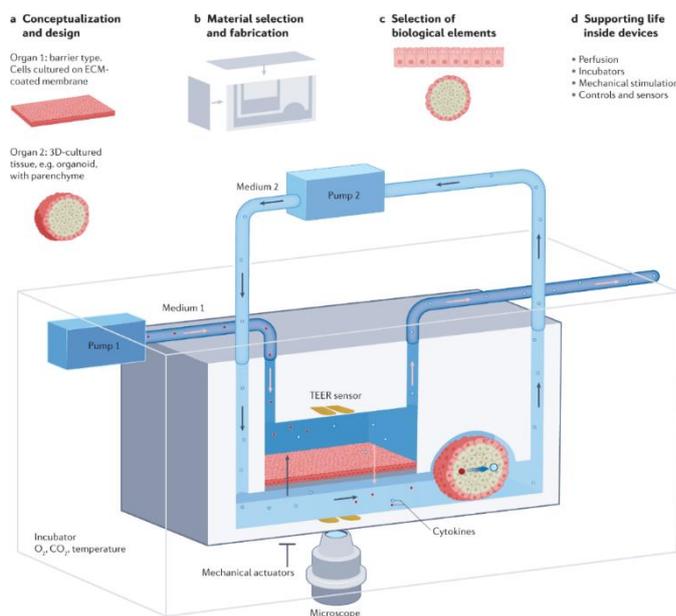


Figura 9: mostrando as etapas a serem observadas para confecção de um dispositivo *organ on a chip* e o modelo simplificado de perfusão. Adaptado de: (Leung *et al.*, 2022)

Todos estes aspectos fazem com que o *organ on a chip* tenha a maior relevância fisiológica entre os modelos de cultura, porém a montagem ocorre em uma escala reduzida. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de um dispositivo para cultura celular que permita o uso em escalas maiores e que também permita uma circulação do meio para as células mais semelhante ao que vemos nos seres vivos, a disponibilização constante, criação de gradientes de difusão de nutrientes/fármacos e possibilidade de co-cultivo com outros tipos celulares como células endoteliais e do sistema imunológico, e a coleta de subprodutos liberados pelas células e/ou metabolizados no meio de cultura.

2. HIPÓTESE

O aprimoramento da técnica de cultivo 3D para pele/mucosa através de desenvolvimento de hidrogel de maior rendimento e de técnicas avançadas de cultivo celular pode melhorar a representatividade biológica e a economicidade de recursos para a realização de ensaios pré-clínicos de larga escala.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aperfeiçoar um modelo *in vitro* tridimensional de pele baseado em cultura organotípica 3D, e criar ferramentas para circulação do meio de cultura por perfusão.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar como diferentes fontes de colágeno influenciam na confecção do modelo e sua relação com as células

3.2.2 Avaliar os efeitos da adição de componentes da matriz extracelular ao modelo sobre o desempenho e a representatividade biológica.

3.2.3 Desenvolver um dispositivo que permita a perfusão e recirculação do meio de cultura para ser utilizado em cultura 3D

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 1

O seguinte artigo refere-se aos objetivos específicos 3.2.1 e 3.2.2. E foi submetido a revista *Connective Tissue Research*. Fator de impacto em 2023: 3.34.

A cultura celular é uma ferramenta essencial para a compreensão de vários processos celulares e dos mecanismos de desenvolvimento de doenças. Há uma tendência crescente para a criação de modelos que sejam cada vez mais fisiologicamente semelhantes aos tecidos vivos. Conseqüentemente, há um esforço contínuo para desenvolver modelos 3D que incorporem diferentes tipos de células e componentes do microambiente celular. A utilização de culturas organotípicas à base de hidrogéis, como o colágeno, tem se mostrado promissora para esses fins. Este estudo avaliou o comportamento do colágeno extraído da cauda de rato e do tendão de porco em um modelo organotípico de pele e a influência dos componentes da matriz extracelular (fibronectina e laminina) neste modelo. Observamos que o uso de colágeno suíno resultou em um modelo com epitélio menos permeável suportado por uma matriz mais porosa e maior atividade de fibroblastos. A adição de componentes da MEC levou a um epitélio mais espesso e maduro e aumentou a atividade dos fibroblastos. O uso de colágeno suíno mostrou-se eficiente, sendo que a adição de componentes da MEC potencializa o modelo de pele artificial.

4.2 Patente

O relatório descritivo da patente de invenção e carta de concessão. CARTA PATENTE Nº BR 102018012631-8, referem-se ao desenvolvimento do objetivo específico 3.2.3.

Um ponto chave a ser elucidado nas técnicas de cultivo 3D é o da perfusão do meio de cultura de forma a mimetizar o que ocorre in vivo. Por mais que as técnicas de microfluídica evoluíram nos últimos tempos, ainda é necessária a criação de dispositivos que possam ser utilizados em escalas maiores. A patente a seguir descreve um dispositivo que pode ser utilizado no cultivo 2D e 3D que permite uma circulação automatizada do meio de cultivo, sua recirculação e captação para análise de conteúdo.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

**REPÚBLICA FEDERATIVA
DO BRASIL**

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR
102018012631-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102018012631-8

(22) Data do Depósito: 20/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/12/2019

(51) Classificação Internacional: C12M 3/00.

(52) Classificação CPC: C12M 3/00.

(54) Título: DISPOSITIVO, MÉTODO E SISTEMA DE CULTIVO CELULAR

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Pessoa Jurídica. Endereço: AV. PAULO GAMA Nº 110, 6º ANDAR, CENTRO, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL(BR), 90040-060, Brasileira

(72) Inventor: LEONARDO FRANCISCO DIEL; BIBIANA FRANZEN MATTE; MARCELO LAZZARONLAMERS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 20/06/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 13/06/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

DISPOSITIVO, MÉTODO E SISTEMA DE CULTIVO CELULAR

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve um dispositivo de cultivo celular, um método de utilização deste dispositivo e um sistema de cultivo celular que compreende este dispositivo que permite a circulação contínua do meio de cultura e sua drenagem. A presente invenção se situa nos campos da medicina, biologia e áreas farmacêuticas.

Antecedentes da Invenção

[0002] O cultivo celular é uma prática muito difundida utilizada para avaliar o comportamento celular, análise de diferentes doenças, teste de novas drogas ou cosméticos entre outros. As técnicas para cultivo necessitam de recipientes para acomodar as células e um meio líquido que contém os nutrientes necessários para o desenvolvimento, replicação e organização das células. A necessidade de deposição e troca do meio de cultura celular ocorre tanto em culturas celulares bidimensionais e tridimensionais ou organotípicas. O processo de troca deste meio é realizado manualmente sobre as células em diferentes intervalos de tempo, que pode ocorrer diariamente ou em intervalos maiores. Isto gera um maior gasto de tempo, maior risco de contaminação da cultura, dificuldade de acesso aos nutrientes para células localizadas em níveis mais baixos de culturas tridimensionais e baixa padronização da disponibilização de reagentes, visto que ocorre uma diminuição gradativa dos nutrientes e/ou fármacos disponíveis para as células com o passar do tempo de cultivo.

[0003] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o

tema:

[0004] O documento Falcon® Product Selection Guide revela garrafas de cultura ou placas para cultura celular, com diversos tamanhos e capacidades para deposição de células para cultivo celular. Nas placas, as células são depositadas juntamente com o meio de cultura, que fica sobre as células, sendo trocado manualmente. Existem ainda biorreatores para cultivo celular, utilizados quando se necessita de um cultivo em ampla escala, utilizados principalmente para produção de proteínas e outros derivados celulares. Estes equipamentos possuem um sistema de injeção e remoção de meio na superfície da cultura, o que dificulta difundir-lo por toda a cultura e não permitem a circulação contínua deste meio.

[0005] Os documentos WO2017122658-A1, WO2016157378-A, WO2016133209-A1, US2015344833-A1, JP2007020411 A, US5424209 e WO2013069309 A1 revelam dispositivos que se propõem ao cultivo celular e realizam uma troca automatizada do meio. O método de troca de meio proposto por estes documentos se baseia na deposição de meio sobre as células e remoção realizada por uma descarga acionada quando o meio atinge determinado nível. Estas soluções, entretanto, não permitem a circulação contínua de meio e sua deposição sobre as células dificulta difundir-lo por toda a cultura.

[0006] Os documentos DE2812640 A1 e DE2813389 A1 revelam um dispositivo que faz a troca do meio através de um sistema de pipetagem automático. Sua deposição sobre as células, entretanto, dificulta difundir o meio por toda a cultura.

[0007] Os documentos WO2005059088 A1, GB0914195 D0, EP0866119 A2 e CN1900265 A revelam uma espécie de placa para cultura de celular, mas que não se dispõe a realizar uma troca automatizada do meio.

[0008] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0009] É ausente no estado da técnica um dispositivo que permite a

troca automatizada de meio, por circulação contínua do meio de cultura, através de infusão, e uma remoção mecânica deste por sucção a vácuo e, além disso, permita que o meio se perfunda entre a base utilizada para culturas celulares tridimensionais, também chamadas de organotípicas, propiciando ambiente semelhante ao encontrado fisiologicamente.

Sumário da Invenção

[0010] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de um dispositivo de cultivo celular, um método de utilização deste dispositivo e um sistema de cultivo celular que compreende este dispositivo que permite a troca automatizada contínua de meio de cultura celular através de infusão, e permite sua drenagem por sucção a vácuo. Ainda, permite que o meio se perfunda entre a matriz utilizada para culturas celulares bidimensionais e culturas tridimensionais, também chamadas de organotípicas, propiciando ambiente semelhante ao fisiológico.

[0011] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um dispositivo de cultivo celular que compreende ao menos:

- a. base(1);
- b. conjunto de canalículos; e
- c. tampa(7);

em que,

- a base (1) possui ressalto de acomodação (2) da tampa (7);
- a base (1) possui orifícios (3) de passagem dos canalículos;
- o conjunto de canalículos possui canalículos de circulação e canalículos de drenagem;
- os canalículos de circulação possuem região de entrada (4), região com micro-orifícios (15) e região de saída (5);
- os canalículos de drenagem possuem região de saída (6) e região com micro-orifícios (16);
- a tampa (7) possui geometria de encaixe vedado na base (1).

[0012] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um método de cultivo celular implementado em um dispositivo de cultivo celular conforme definido anteriormente e que compreende ao menos as etapas de:

- a. seleção da vazão do meio de cultura celular;
- b. injeção automatizada e contínua do meio de cultura na entrada de canalículos de circulação;
- c. perfusão do meio de cultura pelos micro-orifícios dos canalículos de circulação;
- d. saída automatizada e contínua do meio de cultura na saída de canalículos de circulação;
- e. drenagem do meio de cultura pelos micro-orifícios dos canalículos de drenagem; e
- f. armazenamento de conteúdo drenado.

[0013] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um sistema de cultivo celular que realiza a troca automatizada do meio de cultura celular e compreende ao menos:

- a. dispositivo de cultivo celular conforme definido anteriormente;
- b. sistema de bombeamento;
- c. sistema regulador de vazão do meio de cultura celular; e
- d. dispositivo de armazenamento de conteúdo drenado;

em que,

- o sistema regulador de vazão do meio de cultura celular comanda o sistema de bombeamento;
- o sistema de bombeamento compreende mecanismo de bombeamento e mecanismo de drenagem;
- o mecanismo de bombeamento é ligado à entrada (11) e à saída (12) dos canalículos de circulação e ao dispositivo de armazenamento de conteúdo drenado;
- o mecanismo de drenagem é ligado à saída (13) dos canalículos de drenagem.

[0014] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados possibilita realizar a perfusão homogênea do meio de cultura entre a base utilizada para o cultivo, seja este bidimensional ou tridimensional, de maneira automatizada e contínua, reduzindo os riscos de falha humana e contaminação.

[0015] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0016] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presente figuras:

[0017] A figura 1 mostra uma concretização da base (1) da presente invenção compreendendo ressaltado de acomodação (2) da tampa (7).

[0018] A figura 2 mostra uma concretização do conjunto de canalículos da presente invenção, compreendendo orifícios (3) de passagem dos canalículos, região de entrada (4) e região de saída (5) dos canalículos de circulação e região de saída (6) dos canalículos de drenagem.

[0019] A figura 3 mostra uma concretização de uma região de entrada (4) dos canalículos de circulação da presente invenção, compreendendo ângulo (9) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma entrada (11).

[0020] A figura 4 mostra uma concretização de uma região de saída (5) dos canalículos de circulação da presente invenção, compreendendo ângulo (9) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma saída (12).

[0021] A figura 5 mostra uma concretização de uma região de saída (6) dos canalículos de drenagem da presente invenção, compreendendo ângulo (14) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma saída (13).

[0022] A figura 6 mostra uma concretização dos micro-orifícios (15)(16) do conjunto de canalículos da presente invenção.

[0023] A figura 7 mostra uma concretização da tampa (7) da presente invenção compreendendo geometria de encaixe na base (1).

[0024] A figura 8 mostra uma concretização da tampa (7) da presente invenção compreendendo geometria de encaixe na base (1) e saliências removíveis (8) de troca gasosa da cultura com o meio externo da base.

Descrição Detalhada da Invenção

[0025] As descrições que se seguem são apresentadas a título de exemplo e não limitativas ao escopo da invenção e farão compreender de formamais clara o objeto do presente pedido de patente.

[0026] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta um dispositivo de cultivo celular que compreende ao menos: base(1); conjunto de canalículos; e tampa(7).

[0027] A base (1) possui ressalto de acomodação (2) da tampa (7). Em uma concretização, sem que haja limitação do escopo da presente invenção, o ressalto de acomodação (2) da tampa (7) é um degrau positivo e se encontra naparte externa da base (1).

[0028] O conjunto de canalículos possui canalículos de circulação e canalículos de drenagem. Os canalículos de circulação possuem região de entrada (4), região com micro-orifícios (15) e região de saída (5). Os canalículos de drenagem possuem região de saída (6) e região com micro-orifícios (16). Oscanalículos de circulação e os canalículos de drenagem são arranjados paralelamente e intercalados entre si, abrangendo toda a cultura celular distribuída na base (1).

[0029] A base (1) possui orifícios (3) de passagem dos canalículos. A região de entrada (4) dos canalículos de circulação compreende ângulo (9) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma entrada (11). A região de saída (5) dos canalículos de circulação compreende ângulo (9) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma saída (12). A região de saída (6) dos canalículos de drenagem compreende ângulo (14) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma saída de drenagem (13). Em uma concretização, sem que haja limitação do escopo da presente invenção, em uma das paredes laterais da base (1) existem orifícios (3) para passagem dos canalículos de circulação, que fornecem o meio de cultura para o sistema, e na parede oposta há orifícios

(3) com as mesmas medidas para a saída dos canalículos. Ainda, na parede onde estão os orifícios (3) de saída, os orifícios (3) para saída dos canalículos de drenagem do meio de cultura são dispostos entre os orifícios (3) para passagem dos canalículos de circulação.

[0030] A tampa (7) possui geometria de encaixe vedado na base (1) e compreende saliência removível (8) de troca gasosa da cultura com o meio externo da base. Em uma concretização, onde se deseja que a cultura celular não troque gases com o meio externo do dispositivo de cultivo celular, a tampa

(7) realiza encaixe vedado na base (1), impedindo tais trocas gasosas. Em uma concretização, onde se deseja que a cultura celular realize trocas gasosas com o meio externo do dispositivo de cultivo celular, utiliza-se saliências removíveis

(8) que permitem tais trocas gasosas.

[0031] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um método de cultivo celular implementado em um dispositivo de cultivo celular conforme definido anteriormente e que compreende ao menos as etapas de: seleção da vazão do meio de cultura celular; injeção automatizada e contínua do meio de cultura na entrada de canalículos de circulação; perfusão do meio de cultura pelos micro-orifícios dos canalículos de circulação; saída automatizada e contínua do meio de cultura na saída de canalículos de circulação; drenagem do meio de cultura pelos micro-orifícios dos canalículos de drenagem; e armazenamento de conteúdo drenado.

[0032] O método de cultivo celular implementado no dispositivo de cultivo celular da presente invenção compreende etapa de seleção de cultura celular bidimensional e/ou tridimensional. Em uma concretização, ao utilizar um dispositivo de cultivo celular da presente invenção, o usuário pode cultivar células de maneira bidimensional laminar, ou tridimensional organotípica. **[0033]** O método de cultivo celular da presente invenção compreende etapa de seleção de número de tipos celulares em cultura simultânea.

Em uma concretização, ao utilizar um dispositivo de cultivo celular da presente invenção, o usuário pode cultivar simultaneamente mais de um tipo de células.

[0034] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um sistema de cultivo celular que realiza a troca automatizada do meio de cultura celular e compreende ao menos: dispositivo de cultivo celular, definido na presente invenção; sistema de bombeamento; sistema regulador de vazão do meio de cultura celular; e dispositivo de armazenamento de conteúdo drenado.

[0035] O sistema regulador de vazão do meio de cultura celular comanda o sistema de bombeamento. O sistema de bombeamento compreende mecanismo de bombeamento e mecanismo de drenagem. O mecanismo de bombeamento é ligado à entrada (11) e à saída (12) dos canalículos de circulação e ao dispositivo de armazenamento de conteúdo drenado. O mecanismo de drenagem é ligado à saída (13) dos canalículos de drenagem. Em uma concretização, para uma cultura celular que necessite de elevada troca de insumos do meio, o sistema regulador de vazão aciona o sistema de bombeamento, que aciona o mecanismo de bombeamento para bombear o meio pela entrada (11) do conjunto de canalículos, projetando parte do meio pelos micro-orifícios (15)(16) e bombeando o restante pela saída (12) dos canalículos. Ainda, o sistema de bombeamento aciona o mecanismo de drenagem que, ligado à saída (13) dos canalículos de drenagem, realiza a drenagem do meio que é produto da cultura celular, armazenando-o em um dispositivo de armazenamento de conteúdo drenado para posterior aproveitamento.

Exemplos - Concretizações

[0036] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo I

[0037] Em uma concretização, o dispositivo de cultivo celular compreende um recipiente quadrilátero de dimensões variadas, confeccionado em material polimérico transparente e compreende ao menos uma base (1), um conjunto de canalículos e uma tampa (7), sendo o conjunto de canalículos

dividido em canalículos de circulação e canalículos de drenagem. Sua base (1) possui em uma posição próxima ao centro de sua altura um ressalto de acomodação (2) da tampa (7). Em uma de suas paredes laterais, existem orifícios (3) que servem de passagem para a região de entrada (4) dos canalículos na base (1). Na parede lateral oposta, há orifícios com as mesmas medidas para a região de saída (5) dos canalículos de circulação, e orifícios para a região de saída (6) dos canalículos de drenagem. A tampa (7) possui geometria para permitir o encaixe na base (1) por meio do ressalto de acomodação (2). Este encaixe impede a passagem de gases da parte interna do dispositivo de cultivo celular para a parte externa e vice-versa, mas a tampa (7) pode compreender saliências removíveis (8) que criam folga entre a tampa (7) e a base (1) que permite trocas gasosas do cultivo celular com o ambiente externo do dispositivo. Os canalículos de circulação recebem o meio do cultivo celular por uma entrada (11), que se divide em canalículos convergentes (10), que sofrem uma inclinação em ângulo (9) e transpassam uma parede da base (1) em uma região de entrada (4), atravessam a base (1) projetando o meio pelos micro-orifícios (15) e chegam a uma região de saída (5), transpassando uma parede oposta da base (1), sofrem uma inclinação em ângulo (9) para canalículos convergentes (10), que se unem em uma saída (12). Os canalículos de drenagem estão em contato com uma parede da base (1) e atravessam a base (1), de modo a estarem paralelos e intercalados com os canalículos de circulação para melhor distribuição e captação do meio, chegando até uma região de saída (6), transpassando uma parede oposta da base (1), de maneira a sofrer uma inclinação em ângulo (14) para canalículos convergentes (10), que se unem em uma saída (13) que é conectada a um dispositivo de armazenamento do conteúdo drenado.

[0038] A entrada (11) e a saída (12) dos canalículos de circulação estão conectadas a um mecanismo de bombeamento, que é comandado por um sistema de bombeamento e bombeia o meio que será inserido no cultivo celular. A saída (13) dos canalículos de drenagem está conectada a um mecanismo de drenagem, que pode ser uma bomba de vácuo, por exemplo, e é comandado pelo sistema de bombeamento.

[0039] O sistema de bombeamento, por sua vez, é comandado por um

sistema regulador de vazão do meio de cultura celular que regula a vazão do meio conforme parâmetros e comandos fornecidos pelo usuário. O usuário, ao utilizar o dispositivo de cultivo celular, realiza uma etapa de seleção de cultura celular bidimensional e/ou tridimensional, onde é definido se a cultura celular é laminar (bidimensional) ou organotípica (tridimensional). Ainda, o usuário realiza uma etapa de seleção de número de tipos celulares em cultura simultânea, definindo se a cultura celular tem um único tipo de células ou mais de um tipo de células em cultura simultânea. Ainda, o usuário realiza uma etapa de seleção da vazão do meio na cultura. O dispositivo de armazenamento do conteúdo drenado conectado na saída (13) dos canalículos de drenagem armazena o produto drenado do meio de cultivo celular para estudos posteriores e/ou utilização para fins farmacêuticos, médicos e/ou bioquímicos. A utilização da presente invenção confere ao cultivo celular reduz a contaminação proveniente da troca manual do meio, o arranjo do conjunto de canalículos permite desenvolvimento homogêneo de cultivos celulares bidimensionais e tridimensionais e a circulação automatizada constante assemelha o ambiente do cultivo celular a um processofisiológico dos seres vivos.

[0040] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Dispositivo de cultivo celular **caracterizado** por compreender ao menos:
 - a. base (1);
 - b. conjunto de canalículos; e
 - c. tampa (7);

em que,

- a base (1) possui ressalto de acomodação (2) da tampa (7);
- a base (1) possui orifícios (3) de passagem dos canalículos;
- o conjunto de canalículos possui canalículos de circulação e

canalículos de drenagem;

- os canalículos de circulação possuem região de entrada (4), região com micro-orifícios (15) e região de saída (5);
- os canalículos de drenagem possuem região de saída (6) e região com micro-orifícios (16);
- a tampa (7) possui geometria de encaixe vedado na base (1).

2. Dispositivo de cultivo celular de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os canalículos de circulação e os canalículos de drenagem serem arranjados paralelamente e intercalados entre si.

3. Dispositivo de cultivo celular de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de a tampa (7) compreender saliência removível (8) de troca gasosa da cultura com o meio externo da base.

4. Dispositivo de cultivo celular de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de a região de entrada (4) dos canalículos de circulação compreender ângulo (9) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma entrada (11).

5. Dispositivo de cultivo celular de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de a região de saída (5) dos canalículos de circulação compreender ângulo (9) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma saída (12).

6. Dispositivo de cultivo celular de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de a região de saída (6) dos canalículos de drenagem compreender ângulo (14) de canalículos convergentes (10) que se unem em uma saída de drenagem (13).

7. Método de cultivo celular **caracterizado** por ser implementado em um dispositivo de cultivo celular conforme definido na reivindicação 1 e compreenderá menos as etapas de:

- a. seleção da vazão do meio de cultura celular;

- b. injeção automatizada e contínua do meio de cultura na entrada decanálculos de circulação;
- c. perfusão do meio de cultura pelos micro-orifícios dos canalículos de circulação;
- d. saída automatizada e contínua do meio de cultura na saída decanálculos de circulação;
- e. drenagem do meio de cultura pelos micro-orifícios dos canalículos de drenagem; e
- f. armazenamento de conteúdo drenado.

8. Método de cultivo celular de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** por compreender etapa de seleção de cultura celular bidimensional e/ou tridimensional.

9. Método de cultivo celular de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** por compreender etapa de seleção de número de tipos celulares em cultura simultânea.

10. Sistema de cultivo celular **caracterizado** por realizar a troca automatizada do meio de cultura celular e compreender ao menos:

- a. dispositivo de cultivo celular conforme definido na reivindicação 1;
- b. sistema de bombeamento;
- c. sistema regulador de vazão do meio de cultura celular; e
- d. dispositivo de armazenamento de conteúdo drenado;

em que,

- o sistema regulador de vazão do meio de cultura celular comanda o sistema de bombeamento;
- o sistema de bombeamento compreende mecanismo de bombeamento e mecanismo de drenagem;
- o mecanismo de bombeamento é ligado à entrada (11) e à saída (12) dos canalículos de circulação e ao dispositivo de armazenamento de conteúdo drenado;
- o mecanismo de drenagem é ligado à saída (13) dos canalículos de drenagem.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Por muitos anos o cultivo de células 2D foi o padrão para os mais variados tipos de estudo, que permitiram grandes avanços na nossa compreensão sobre complexa maquinaria celular, sobre os processos fisiológicos que ocorrem em homeostase para o correto funcionamento de tecidos, órgãos e sistemas, o que podemos chamar de saúde. Estes estudos serviram para elucidar as alterações que ocorrem em níveis moleculares e levam ao desenvolvimento das doenças, bem como para teste da ação de fármacos.

Se criou um padrão de ensaios para o teste de novas drogas com potencial terapêutico: ensaios *in vitro* utilizando a linhagem celular de interesse, seguido de estudos *in vivo* com animais e ensaios clínicos randomizados de fase 1, 2 e 3 que utilizam pacientes. Os dados mostram que milhares de dólares são gastos anualmente na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, principalmente para o tratamento do câncer. Por mais que os ensaios e as formas de análises tenham se tornado mais precisos, pois hoje a análise de pequenas moléculas envolvidas em vias de sinalização é muito utilizada, o insucesso na transposição dos ensaios do *in vitro* para o *in vivo* ainda é muito grande visto que em torno de 90% das drogas testadas falham nos ensaios clínicos.

O avanço na compreensão da forma como vemos a célula, tem mostrado que os ensaios 2D representam parcialmente a complexidade fisiológica encontrada nos seres em vivos. As células depositadas em uma monocamada, alteram a sua morfologia, pois a interação célula a célula ocorre em apenas uma dimensão, a polarização não ocorre, genes acabam sendo silenciados, o crescimento destas é limitado pelo espaço e pelos nutrientes fornecidos pelo meio de cultura, o que altera o metabolismo celular. Como o meio e o oxigênio chegam a todas as células de forma uniforme, não existe um gradiente de dispersão. Quando adicionamos drogas ao cenário, estas também

ficam disponível para todas células, o que acaba por superestimar o efeito destas. O fato de utilizarmos somente uma linhagem de célula de cada vez e analisarmos separadamente os efeitos em cada linhagem não condiz com as inúmeras interações entre células encontradas nos tecidos. Todos esses fatores estão relacionados aos insucessos quando transpomos os estudos *in vitro* para os testes com animais.

Os modelos 3D surgiram como alternativa para enfrentar esses problemas, sendo fisiologicamente mais complexos. Entre os modelos 3D em uma escala de crescente representatividade biológica nós temos: o ensaio de esferas, as culturas organotípicas, os organoides e o “*organ on a chip*”. O ensaio de esferoide é o de mais fácil execução, e se mostra um modelo interessante no qual observamos que o comportamento natural das células é de se agregar, e nessa esfera conseguimos um gradiente de difusão de meio, nutrientes e drogas. Já os ensaios de cultura organotípica, buscam construir um tecido que seja estruturalmente semelhante ao *in vivo*, seja em relação a morfologia, ao número de camadas ou quanto aos componentes celulares e químicos presentes. Já o organoide é uma estratégia para construir um mini órgão com representatividade celular e funcional, construído a partir de células tronco ou de fragmentos de biópsia sendo útil na investigação de distúrbios específicos do órgão e como o silenciamento de genes alvo ou um fármaco afeta o desenvolvimento e progressão da doença. E, por fim, o “*organ on a chip*” que pode utilizar os modelos já citados, permitindo uma interação entre diferentes células, tecidos ou órgãos por meio de um sistema de microfluídica.

Os modelos 3D apresentam maior desafio técnico para confecção, e a necessidades de algo que sustente estas células. Neste ponto os hidrogéis, que são amplamente utilizados, estes podem ser sintéticos ou naturais, e devem apresentar biocompatibilidade permitindo que as células consigam se aderir e proliferar. As pesquisas buscam criar alternativas para que se consiga alterar as propriedades físicas dos hidrogéis, de forma a ajustar a viscosidade, a capacidade de moldar esse a um formato previamente estabelecido e que tenha a porosidade adequada ao tipo celular que se deseja trabalhar (Chai *et al.*, 2017)

Entre os hidrogéis naturais, o colágeno do tipo I tem sido muito utilizado. O colágeno é o componente principal da matriz extracelular dos seres vivos, e possuem uma capacidade biomimética formar um rede polimérica em as células encontram suporte para aderir, porém possui uma fraca resistência mecânica (Cao *et al.*, 2021). Nesta tese, foi utilizado o colágeno extraído de cauda de rato e de tendão suíno, sendo que o tendão suíno apresenta vantagem quanto a sua fácil obtenção e um maior rendimento de produção quando comparado com colágeno de cauda de rato. O colágeno suíno produz uma matriz mais porosa o que pode melhorar difusão do meio de cultura e oxigênio para o interior da matriz, o que pode estar relacionado ao aumento na proliferação de fibroblastos e na secreção de fatores da matriz extracelular.

A matriz extracelular além do colágeno é composta por diversas glicoproteínas que não só fornecem um arcabouço de sustentação para as células, mas estabelecem uma relação com as células, atuando na adesão, proliferação e migração celular. A adição de fibronectina e laminina na matriz extracelular mostrou-se eficaz: a laminina adicionada ao colágeno de suíno aumentou a espessura da camada epitelial, já a fibronectina, laminina ou a associação delas levam a um aumento dos marcadores epiteliais, filagrina, aquaporina e queratina 10, provavelmente por melhorar a adesão das células epiteliais ao colágeno.

Há uma crescente corrente que busca a substituição do uso de animais, para testes laboratoriais de cosméticos e fármacos. Modelos comerciais de pele e mucosa, já são bem aceitos para testes na indústria cosmética, para avaliação de segurança e eficácia de novos produtos (Bédard *et al.*, 2020). Um outro campo a ser explorado é o de desenvolvimento de modelos de doenças como o câncer oral, mal de Alzheimer, ou doenças genéticas. A possibilidade de utilizar linhagens tumorais ou de fazer a manipulação gênica de células normais, permite avanços na forma como entendemos as doenças e de como os fármacos interagem com estes tecidos e órgãos (Powell, 2018).

Na última década avanços no isolamento, cultivo e diferenciação de células tronco pluripotentes permitiu avanços no desenvolvimento de organoides, que recapitulam a diferenciação celular, padronização espacial e

morfogênese. Hoje temos exemplos de organoides de regiões cerebrais, pulmão, fígado, intestino estômago, rim. E a possibilidade de manipular esses organoides, aprofundando o conhecimento sobre a organogênese, ou sobre a desenvolvimento de patologias, faz desses modelos uma excelente ferramenta para o descobrimento de vias com potencial terapêutico, para a descoberta de medicamentos, diagnósticos complementares personalizados, terapia celular e teste de fármacos (Clevers, 2016; Zhao *et al.*, 2022). Se aliarmos estes organoides à sistemas de microfluídica, estabelecemos modelos que conectam sistemas diferentes, permitindo a circulação de meio e a troca de moléculas e análises mais acurados do efeito de drogas (Park *et al.*, 2019).

Estes modelos podem ser utilizados, no desenvolvimento de estratégias de medicina personalizada, que leva em consideração as características individuais de cada paciente para individualizar o diagnóstico e tratamento das doenças, o que reduz custos de tratamento e otimiza resultados. Um exemplo é o tratamento do câncer, onde já existem estudos que utilizam fragmentos de biopsia levadas ao laboratório e cultivadas, passando por avaliações genômicas e de perfil molecular, desenvolvendo uma abordagem terapêutica, que leve em conta a especificidade do tumor e que possa ser testada *in vitro* em modelos de organoides (Bose *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021).

A escolha do modelo 3D vai depender do tecido que se quer mimetizar, de quais análises pretendemos realizar, o tipo do hidrogel pode variar de célula para célula, outros componentes, celulares ou proteicos da matriz extracelular também podem ser incorporados, bem como fatores de crescimento, numa tentativa tornar o mais fisiologicamente semelhante ao tecido. O ramo da bioengenharia de tecidos avança na base de tentativa, erro e acerto. Modificando estruturas combinando elementos na busca por um “blend” ideal que satisfaça as células.

6 PERSPECTIVAS

Com o avanço da tecnologia e a popularização da técnica de cultivo celular, observa-se a tendência de que os modelos de cultivo se tornem mais complexos e que consigam representar com maior precisão os processos metabólicos e fisiológicos. A busca de alternativas para melhorar a extração de colágeno e a pesquisa de novos hidrogéis com boas propriedades biomiméticas é um campo promissor nos próximos anos, bem como a adição de outros fatores presentes na matriz extracelular, de forma a se produzir biotintas específicas com potencial uso em humanos (ex.: cicatrização).

Outra necessidade é a de substituição do colágeno por hidrogéis sintéticos, que possuam as mesmas características biomiméticas e de biocompatibilidade do colágeno e que possa ser produzido de forma padronizada e em larga escala. Adicionalmente, o desenvolvimento de componentes da matriz extracelular sintéticos que possam ser utilizados nos modelos substituindo as proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas adesivas observadas na MEC em seres vivos. Entretanto, para se obter os melhores hidrogéis sintéticos, ainda torna-se necessário estabelecer o padrão ouro de composição e indução dos estratos de pele/mucosa artificial.

O desenvolvimento de sistemas de circulação que trabalhem em macro escala, devem ser pesquisados para suprir a demanda por análise de metabólitos e teste de biodisponibilização de drogas. Adicionalmente, o co-cultivo com células endoteliais permitirá o melhor entendimento das relações entre células, como a liberação de fatores de crescimento necessários para o pleno desenvolvimento do ambiente 3D mais complexos.

No caso da Odontologia, o aprimoramento da técnica de cultura 3D permitirá o estabelecimento de outros modelos *in vitro* para estudos básicos e aplicados, tendo com o principal exemplo o carcinoma espinocelular oral e desordens potencialmente malignas.

Portanto, o investimento em tecnologia e na formação de recursos humanos especializados torna-se fundamental para o desenvolvimento da

indústria 4.0 na área da saúde, com potencial uso na Medicina, e Odontologia, personalizada.

7. REFERÊNCIAS

- ALAM, M. R. et al. Sources, extractions and applications of bio-maker collagen—A review. **Biomedical Engineering Advances**, v. 4, p. 100064, 2022/12/01/ 2022. ISSN 2667-0992. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667099222000408> >.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell / Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter ; with problems by John Wilson, Tim Hunt**. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015. ISBN 9781315735368.
- ANTHON, S. G.; VALENTE, K. P. Vascularization Strategies in 3D Cell Culture Models: From Scaffold-Free Models to 3D Bioprinting. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 23, Nov 23 2022. ISSN 1422-0067.
- ARDA, O.; GOKSUGUR, N.; TUZUN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clin Dermatol**, v. 32, n. 1, p. 3-13, Jan-Feb 2014. ISSN 0738-081x.
- ASADISHEKARI, M. et al. Three-Dimensional Tunable Fibronectin-Collagen Platforms for Control of Cell Adhesion and Matrix Deposition. **Frontiers in Physics**, v. 10, 2022. ISSN 2296-424X. Available at: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2022.806554> >.
- AUMAILLEY, M. The laminin family. **Cell Adh Migr**, v. 7, n. 1, p. 48-55, Jan-Feb 2013. ISSN 1933-6918 (Print)1933-6918.
- BADR-ELDIN, S. M. et al. **Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects**. **Pharmaceuticals**. 15 2022.
- BIAŁKOWSKA, K. et al. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 17, Aug 28 2020. ISSN 1422-0067.
- BOLLAG, W. B. et al. Aquaporin-3 in the epidermis: more than skin deep. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 318, n. 6, p. C1144-c1153, Jun 1 2020. ISSN 0363-6143 (Print)0363-6143.
- BOSE, S.; CLEVERS, H.; SHEN, X. Promises and Challenges of Organoid-Guided Precision Medicine. **Med**, v. 2, n. 9, p. 1011-1026, Sep 10 2021. ISSN 2666-6359 (Print)2666-6340.
- BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. Chapter 2 - Extracellular Matrix as an Inductive Scaffold for Functional Tissue Reconstruction. In: LAURENCE, J. (Ed.). **Translating Regenerative Medicine to the Clinic**. Boston: Academic Press, 2016. p.11-29. ISBN 978-0-12-800548-4.
- BÉDARD, P. et al. Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. **Bioengineering (Basel)**, v. 7, n. 3, Sep 17 2020. ISSN 2306-5354 (Print)2306-5354.
- CALIARI, S. R.; BURDICK, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. **Nature Methods**, v. 13, n. 5, p. 405-414, 2016/05/01 2016. ISSN 1548-7105. Available at: < <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839> >.
- CAO, H. et al. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 426, 2021/12/16 2021. ISSN 2059-3635. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x> >.

CARLETTI, E.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. **Methods Mol Biol**, v. 695, p. 17-39, 2011. ISSN 1064-3745.

CARVALHO, V. et al. The integration of spheroids and organoids into organ-on-a-chip platforms for tumour research: A review. **Bioprinting**, v. 27, p. e00224, 2022/08/01/ 2022. ISSN 2405-8866. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405886622000343> >.

CHAI, Q.; JIAO, Y.; YU, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. **Gels**, v. 3, n. 1, Jan 24 2017. ISSN 2310-2861.

CLEVERS, H. Modeling Development and Disease with Organoids. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1586-1597, Jun 16 2016. ISSN 0092-8674.

CONWAY, J. R. W. et al. Three-dimensional organotypic matrices from alternative collagen sources as pre-clinical models for cell biology. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16887, 2017/12/04 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17177-5> >.

DALTON, C. J.; LEMMON, C. A. Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. **Cells**, v. 10, n. 9, Sep 16 2021. ISSN 2073-4409.

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay Drug Dev Technol**, v. 12, n. 4, p. 207-18, May 2014. ISSN 1540-658X (Print)1540-658x.

FANG, Y.; EGMEN, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. **SLAS Discovery**, v. 22, n. 5, p. 456-472, 2017/06/01/ 2017. ISSN 2472-5552. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2472555222125219> >.

FISCHER, T.; HAYN, A.; MIERKE, C. T. Fast and reliable advanced two-step pore-size analysis of biomimetic 3D extracellular matrix scaffolds. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8352, 2019/06/07 2019. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44764-5> >.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195-200, Dec 15 2010. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533.

GULDAGER KRING RASMUSSEN, D.; KARSDAL, M. A. Chapter 29 - Laminins. In: KARSDAL, M. A. (Ed.). **Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin**: Academic Press, 2016. p.163-196. ISBN 978-0-12-809847-9.

GUNTI, S. et al. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 4, Feb 19 2021. ISSN 2072-6694 (Print)2072-6694.

GYLES, D. A. et al. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. **European Polymer Journal**, v. 88, p. 373-392, 2017/03/01/ 2017. ISSN 0014-3057. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305716312502> >.

HABANJAR, O. et al. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 22, Nov 11 2021. ISSN 1422-0067.

HALDER, S. K.; SAPKOTA, A.; MILNER, R. The impact of genetic manipulation of laminin and integrins at the blood-brain barrier. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 19, n. 1, p. 50,

2022/06/11 2022. ISSN 2045-8118. Available at: < <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00346-8> >.

HAMILL, K. J. et al. Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 24, p. 4409-17, Dec 15 2009. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533.

HAN, S. et al. 3D Bioprinted Vascularized Tumour for Drug Testing. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 8, Apr 23 2020. ISSN 1422-0067.

HARGROVE-GRIMES, P.; LOW, L. A.; TAGLE, D. A. Microphysiological Systems: Stakeholder Challenges to Adoption in Drug Development. **Cells Tissues Organs**, v. 211, n. 3, p. 269-281, 2021. ISSN 1422-6405. Available at: < <https://doi.org/10.1159/000517422> >. Accessed on: 11/7/2023.

HAUSER, P. V. et al. Bioprinting Scaffolds for Vascular Tissues and Tissue Vascularization. **Bioengineering (Basel)**, v. 8, n. 11, Nov 6 2021. ISSN 2306-5354 (Print)2306-5354.

HEO, D. N.; HOSPODIUK, M.; OZBOLAT, I. T. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 95, p. 348-356, Sep 1 2019. ISSN 1742-7061.

HOFFMANN, G. A.; SMITH, M. L. New Insights into Collagen and Fibronectin Reciprocity during Extracellular Matrix Formation. **Chem**, v. 5, n. 8, p. 1930-1932, 2019/08/08/ 2019. ISSN 2451-9294. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451929419303213> >.

HOHENESTER, E. Structural biology of laminins. **Essays Biochem**, v. 63, n. 3, p. 285-295, Sep 13 2019. ISSN 0071-1365 (Print)0071-1365.

HUSSEY, G. S.; DZIKI, J. L.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, v. 3, n. 7, p. 159-173, 2018/07/01 2018. ISSN 2058-8437. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0023-x> >.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Front Mol Biosci**, v. 7, p. 33, 2020. ISSN 2296-889X (Print)2296-889x.

JONES, C. A. et al. The spatial-temporal characteristics of type I collagen-based extracellular matrix. **Soft Matter**, v. 10, n. 44, p. 8855-63, Nov 28 2014. ISSN 1744-683x.

JUNKER, J. L.; HEINE, U. I. Effect of Adhesion Factors Fibronectin, Laminin, and Type IV Collagen on Spreading and Growth of Transformed and Control Rat Liver Epithelial Cells. **Cancer Research**, v. 47, n. 14, p. 3802-3807, 1987. ISSN 0008-5472. Accessed on: 9/13/2023.

KAPAŁCZYŃSKA, M. et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. **Arch Med Sci**, v. 14, n. 4, p. 910-919, Jun 2018. ISSN 1734-1922 (Print)1734-1922.

KARAMANOS, N. K. et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **Febs j**, v. 288, n. 24, p. 6850-6912, Dec 2021. ISSN 1742-464x.

KARMIRIAN, K. et al. Modeling Alzheimer's Disease Using Human Brain Organoids. **Methods Mol Biol**, v. 2561, p. 135-158, 2023. ISSN 1064-3745.

KIM, W. et al. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. **Bioactive Materials**, v. 19, p. 50-74, 2023/01/01/ 2023. ISSN 2452-199X. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X22001554> >.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **J Tissue Eng**, v. 5, p. 2041731414557112, 2014. ISSN 2041-7314 (Print)2041-7314.

LANGHANS, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 6, 2018. ISSN 1663-9812 (Print)1663-9812.

LASCHKE, M. W.; GU, Y.; MENGER, M. D. Replacement in angiogenesis research: Studying mechanisms of blood vessel development by animal-free in vitro, in vivo and in silico approaches. **Front Physiol**, v. 13, p. 981161, 2022. ISSN 1664-042X (Print)1664-042x.

LEBERFINGER, A. N. et al. Concise Review: Bioprinting of Stem Cells for Transplantable Tissue Fabrication. **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 10, p. 1940-1948, Oct 2017. ISSN 2157-6564 (Print)2157-6564.

LEUNG, C. M. et al. A guide to the organ-on-a-chip. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 2, n. 1, p. 33, 2022/05/12 2022. ISSN 2662-8449. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6> >.

LIN, Y. K.; LIU, D. C. Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species. **Food Chemistry**, v. 99, n. 2, p. 244-251, 2006/01/01/ 2006. ISSN 0308-8146. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006394> >.

LOW, L. A. et al. Organs-on-chips: into the next decade. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 5, p. 345-361, 2021/05/01 2021. ISSN 1474-1784. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0079-3> >.

MAGDALENA, J.-S. History of Cell Culture. In: SIVAKUMAR JOGHI THATHA, G. (Ed.). **New Insights into Cell Culture Technology**. Rijeka: IntechOpen, 2017. p.Ch. 1. ISBN 978-953-51-3134-2.

MAJI, S.; LEE, H. Engineering Hydrogels for the Development of Three-Dimensional In Vitro Models. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 5, Feb 28 2022. ISSN 1422-0067.

MANDUCA, N. et al. 3D cancer models: One step closer to in vitro human studies. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1175503> >.

MEHROTRA, R. et al. A cross-sectional study evaluating chemiluminescence and autofluorescence in the detection of clinically innocuous precancerous and cancerous oral lesions. **J Am Dent Assoc**, v. 141, n. 2, p. 151-6, Feb 2010. ISSN 0002-8177.

MIEREMET, A. et al. Recapitulation of Native Dermal Tissue in a Full-Thickness Human Skin Model Using Human Collagens. **Tissue Eng Part A**, v. 24, n. 11-12, p. 873-881, Jun 2018. ISSN 1937-3341.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 771-785, 2014/12/01 2014. ISSN 1471-0080. Available at: < <https://doi.org/10.1038/nrm3902> >.

MULLER, S. et al. Human adipose stromal-vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 7250, May 10 2019. ISSN 2045-2322.

MURAKAMI, M.; SIMONS, M. Regulation of vascular integrity. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 87, n. 6, p. 571-582, 2009. ISSN 1432-14400946-2716. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19337719> >. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2866175/> >.

NAHIRNEY, P. C.; OVALLE, W. K. **Netter Bases Da Histologia**. ELSEVIER (MEDICINA), 2014. ISBN 9788535273106. Available at: < <https://books.google.com.br/books?id=hrdQvgAACAAJ> >.

OBERLEY, T. D.; STEINERT, B. W. Effect of the extracellular matrix molecules fibronectin and laminin on the adhesion and growth of primary renal cortical epithelial cells. **Virchows Archiv B**, v. 44, n. 1, p. 337-354, 1983/01/01 1983. ISSN 0340-6075. Available at: < <https://doi.org/10.1007/BF02890182> >.

PAPARIELLO, A.; NEWELL-LITWA, K. Human-Derived Brain Models: Windows into Neuropsychiatric Disorders and Drug Therapies. **Assay Drug Dev Technol**, v. 18, n. 2, p. 79-88, Feb/Mar 2020. ISSN 1540-658x.

PARK, S. E.; GEORGESCU, A.; HUH, D. Organoids-on-a-chip. **Science**, v. 364, n. 6444, p. 960-965, Jun 7 2019. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

PARK, Y.; HUH, K. M.; KANG, S. W. Applications of Biomaterials in 3D Cell Culture and Contributions of 3D Cell Culture to Drug Development and Basic Biomedical Research. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 5, Mar 2 2021. ISSN 1422-0067.

PIRAINO, S. W. et al. Mutations: Driver Versus Passenger. In: BOFFETTA, P. e HAINAUT, P. (Ed.). **Encyclopedia of Cancer (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2019. p.551-562. ISBN 978-0-12-812485-7.

POMPILI, S. et al. The Charming World of the Extracellular Matrix: A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021. ISSN 2296-858X. Available at: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.610189> >.

POWELL, K. Technology Feature | Replacing the replacements: Animal model alternatives. **Science**, v. 362, n. 6411, p. 246-246, 2018/10/12 2018. Available at: < <https://doi.org/10.1126/science.362.6411.246-b> >. Accessed on: 2023/11/12.

RANA, D. et al. Collagen-Based Hydrogels for the Eye: A Comprehensive Review. **Gels**, v. 9, n. 8, Aug 9 2023. ISSN 2310-2861.

RANDALL, M. J. et al. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 6, p. 154, 2018. ISSN 2296-4185 (Print)2296-4185.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th Edition**. Lippincott, 1979. ISBN 9780397520893. Available at: < <https://books.google.com.br/books?id=P42YQgAACAAJ> >.

SANYAL, S. Culture and assay systems used for 3D cell culture. **Corning**, v. 9, p. 1-18, 2014.

SHIHHARA, M.; FURUKAWA, T. Application of Patient-Derived Cancer Organoids to Personalized Medicine. **J Pers Med**, v. 12, n. 5, May 13 2022. ISSN 2075-4426 (Print)2075-4426.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 26, p. 397-419, 2010. ISSN 1081-0706 (Print)1081-0706.

SMYREK, I. et al. E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. **Biol Open**, v. 8, n. 1, Jan 24 2019. ISSN 2046-6390 (Print)2046-6390.

SUN, B. The mechanics of fibrillar collagen extracellular matrix. **Cell Rep Phys Sci**, v. 2, n. 8, Aug 18 2021. ISSN 2666-3864.

TAYLOR, M. W. A History of Cell Culture. In: TAYLOR, M. W. (Ed.). **Viruses and Man: A History of Interactions**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p.41-52. ISBN 978-3-319-07758-1.

TEMPLE, J. et al. Current strategies with implementation of three-dimensional cell culture: the challenge of quantification. **Interface Focus**, v. 12, n. 5, p. 20220019, Oct 6 2022. ISSN 2042-8898 (Print)2042-8898.

TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnol Bioeng**, v. 103, n. 4, p. 655-63, Jul 1 2009. ISSN 0006-3592 (Print)0006-3592.

TIMPSON, P. et al. Organotypic collagen I assay: a malleable platform to assess cell behaviour in a 3-dimensional context. **J Vis Exp**, n. 56, p. e3089, Oct 13 2011. ISSN 1940-087x.

VINCI, M. et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biol**, v. 10, p. 29, Mar 22 2012. ISSN 1741-7007.

WILLIAMS, C. M. et al. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. **Cancer Res**, v. 68, n. 9, p. 3185-92, May 1 2008. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472.

XU, K.; CLEAVER, O. Tubulogenesis during blood vessel formation. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 9, p. 993-1004, Dec 2011. ISSN 1084-9521.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reprod Med Biol**, v. 16, n. 2, p. 99-117, Apr 2017. ISSN 1445-5781 (Print)1445-5781.

YUE, B. Biology of the extracellular matrix: an overview. **J Glaucoma**, v. 23, n. 8 Suppl 1, p. S20-3, Oct-Nov 2014. ISSN 1057-0829 (Print)1057-0829.

ZE, Y. et al. Biodegradable Inks in Indirect Three-Dimensional Bioprinting for Tissue Vascularization. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 10, p. 856398, 2022. ISSN 2296-4185 (Print)2296-4185.

ZHAO, Z. et al. Organoids. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 2, n. 1, p. 94, 2022/12/01 2022. ISSN 2662-8449. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y> >.

ZHOU, Z.; CONG, L.; CONG, X. Patient-Derived Organoids in Precision Medicine: Drug Screening, Organoid-on-a-Chip and Living Organoid Biobank. **Front Oncol**, v. 11, p. 762184, 2021. ISSN 2234-943X (Print)2234-943x.

ZOVEIN, A. C. et al. Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. **Dev Cell**, v. 18, n. 1, p. 39-51, Jan 19 2010. ISSN 1534-5807.