

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Métodos alternativos ao uso de modelos animais
no desenvolvimento de fármacos e em ensaios
pré-clínicos de novos medicamentos**

Gabriela Sinder Calichman

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Silvy Stuchi Maria-
Engler

São Paulo

2023

SUMÁRIO

	Pág
LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS.....	3
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
4.1 Metodologias alternativas aos modelos animais	8
4.1.1 Organoides	9
4.1.2 Órgãos em chips	16
4.1.3 Tecidos vivos bioimpressos	23
5. CONCLUSÃO	32
6. BIBLIOGRAFIA	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ONG	Organização Não Governamental
HSI	“Humane Society International”
PETA	“People for the Ethical Treatment of Animals”
DOU	Diário Oficial da União
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
RNA	Ácido Ribonucleico
HNF4 α	Fator Nuclear do Hepatócito 4 alfa
IL	Interleucina
Th2	T auxiliar 2
JAK	Janus Quinase
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
VCAM	Molécula de Adesão Vascular
ATP	Adenosina Trifosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organoides de cérebro inteiro e de prosencéfalo dorsal

Figura 2: Comparação entre organoides com e sem tratamento com amiodarona

Figura 3: Pulmão em chip

Figura 4: Comparação da porcentagem de células apoptóticas entre os diferentes tumores pulmonares em chips

Figura 5: Impressora 3D com funcionamento a base da técnica de extrusão

Figura 6: Epiderme obtida pela técnica de bioimpressão 3D

Figura 7: Comparativo da capacidade de restauração da função barreira da pele para cada medicamento estudado, considerando os dois tipos de pele bioimpressa estudados

Figura 8: Efeitos histológicos do trovafloxacino sobre o tecido bioimpresso

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos da nicotina obtidos *in vivo* com os obtidos com o sistema de chips multi-órgãos

RESUMO

CALICHMAN, G. S. **Metodologias alternativas ao uso de modelos animais no desenvolvimento de fármacos e em ensaios pré-clínicos de novos medicamentos**. 2023. 38 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: testes em animais, organoides, órgãos em chips, tecidos vivos bioimpressos

INTRODUÇÃO: Os testes em animais vêm acompanhando o ser humano ao longo da história, chegando até os dias de hoje. Entretanto, nas últimas décadas, houve um aumento na conscientização da população acerca desse tópico. Sendo assim, pesquisadores têm realizado a busca por metodologias alternativas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de fármacos e ensaios pré-clínicos de novos medicamentos. Esse trabalho terá como enfoque três principais métodos alternativos, sendo eles os organoides, órgãos em chips e tecidos vivos bioimpressos. **OBJETIVO:** O objetivo desse trabalho é apresentar, explicar e analisar alguns dos principais métodos alternativos ao uso de animais na pesquisa e ensaios pré-clínicos de novos medicamentos disponíveis na literatura. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O método utilizado para elaboração do trabalho foi a revisão da literatura. Assim, foram pesquisados artigos científicos disponíveis em plataformas como Pubmed, Google Acadêmico e Scielo. Além disso, o livro “Organotypic Models in Drug Development” foi utilizado como base para selecionar as metodologias alternativas que serão apresentadas. **RESULTADOS e DISCUSSÃO:** Para cada metodologia, foram analisados diversos estudos demonstrando a segurança e eficácia para uso no desenvolvimento de fármacos e ensaios pré-clínicos de novos medicamentos. **CONCLUSÃO:** Dentre as metodologias analisadas, cada uma apresenta suas particularidades, mas de forma geral elas são

capazes de mimetizar o funcionamento dos órgãos e tecidos *in vivo*, permitindo o estudo de doenças e da ação de medicamentos.

1. INTRODUÇÃO

A experimentação animal vem acompanhando o ser humano ao longo da história. Presentes na Grécia antiga e no Império Romano, os testes em animais eram realizados com o intuito de entender a anatomia e fisiologia humana. Já no Renascimento, estes eram utilizados principalmente nas áreas de farmacologia e medicina e, mais recentemente, foram inseridos no mercado da beleza. Independentemente do intuito, a experimentação animal ocorre há séculos e segue até os dias de hoje.^{1,2}

Nas últimas décadas, entretanto, é possível observar um aumento na conscientização dos cientistas e da população em geral a respeito dos testes realizados em animais. O surgimento de ONGs de proteção animal, como a HSI e a PETA, demonstra a preocupação da população em geral com esse tópico. Essas organizações são de extrema importância, já que trazem para o debate temas relacionados aos direitos animais, além de estimularem a pesquisa dos métodos alternativos.^{3,4}

Além disso, é importante ressaltar o movimento mundial “Cruelty Free”. O objetivo principal dele é demonstrar marcas na área de cosméticos, produtos de higiene e perfumes nas quais tanto os componentes individuais quanto os produtos finais não foram testados em animais. Essas empresas devem ser certificadas por organizações de proteção animal como a PETA ou a Leaping Bunny, para então receber o rótulo de “Cruelty Free”.^{4,5,6}

No que diz respeito a organizações governamentais, a temática da experimentação animal também está constantemente em debate e análise. Em março de 2023, por exemplo, foi publicada no DOU pelo CONCEA uma resolução que proíbe o uso de animais vertebrados na pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de cosméticos,

produtos de higiene pessoal e perfumes no Brasil⁷. Na União Europeia, por exemplo, esse tipo de teste é proibido desde 2013.⁸

Além das questões éticas envolvidas nos testes em animais, é relevante ressaltar também a questão econômica. Além do uso e dos cuidados dos animais em si terem um valor elevado, a demanda e a procura por produtos não testados em animais está cada vez mais alta. Um estudo do Market Research Future mostra que o mercado de cosméticos “Cruelty Free” deve atingir a marca de 14.26 bilhões de dólares até o ano de 2030⁹. Outro estudo do Allied Market Research trouxe o dado de que em 2021, o mercado global de produtos não testados em animais (incluindo farmacêuticos e cosméticos) atingiu a marca de 9.8 bilhões de dólares e está projetado para atingir 29.4 bilhões até 2030.¹⁰

No campo dos medicamentos, a experimentação animal ainda é utilizada amplamente, uma vez que serve como parâmetro para analisar a eficácia e segurança de moléculas e substâncias. Entretanto, apesar de não serem proibidos, os testes em animais são metodicamente regulamentados e fiscalizados. O principal órgão governamental responsável por esse processo no Brasil é o CONCEA, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.¹¹

Considerando então os aspectos principalmente éticos e econômicos do uso de animais para experimentação, tem-se realizado a busca por métodos alternativos ao uso de animais para serem usados na pesquisa, desenvolvimento e ensaios pré-clínicos de novos compostos, sendo que esse trabalho irá evidenciar os métodos mais focados para a área de medicamentos. A base para a elaboração dessas novas tecnologias é a ideologia dos 3R: redução, refinamento e substituição (em inglês, “reduction”, “refinement” e “replacement”) do uso de animais em laboratório. Com relação a redução, tem-se a ideia de diminuir a quantidade de animais utilizados. Já o refinamento está relacionado ao fato de que os testes devem ser planejados de tal maneira que visem a minimização de dor, estresse e sofrimento dos animais utilizados. Por fim, a substituição consiste na ideia de que animais mais complexos devem

ser substituídos por experimentos *in vitro* e metodologias alternativas.^{12,13}

As metodologias alternativas desenvolvidas são diversas e se classificam em duas principais abordagens: *in vitro* e *in silico*, sendo a primeira realizada em ambiente controlado, fora do organismo vivo, e a segunda utilizando métodos computacionais. Esse trabalho irá focar em 3 metodologias *in vitro* e suas principais aplicações, sendo elas os organoides, os órgãos em chips e os tecidos vivos bioimpressos.¹⁴

2. OBJETIVO(S)

O principal objetivo desse trabalho é apresentar, explicar e analisar alguns dos principais métodos alternativos ao uso de animais na pesquisa e ensaios pré-clínicos de novos medicamentos disponíveis na literatura, mostrando suas principais aplicações na atualidade e perspectivas futuras.

É importante ressaltar que esse trabalho não visa defender o fim do uso da experimentação animal na área farmacêutica, dado que as metodologias alternativas ainda não substituem completamente o uso de organismos vivos. Entretanto, o trabalho pretende demonstrar e conscientizar que, devido às tecnologias alternativas emergentes com eficácia comprovada, os testes em animais podem ser diminuídos e utilizados em casos estritamente necessários.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi elaborado utilizando o método de revisão da literatura. Sendo assim, foram utilizados livros, revistas e artigos científicos como base. Através das bases de dados digitais PubMed e Scielo foi possível acessar diversos artigos científicos relevantes para o desenvolvimento do trabalho. O livro “Organotypic Models in Drug Development” foi utilizado como base para selecionar as metodologias alternativas ao uso dos testes em animais que serão apresentadas e analisadas nesse trabalho.

Para entender melhor o contexto atual da questão da experimentação animal e metodologias alternativas, foram consultados sites e textos de grandes ONGs atuantes nessa área, sendo elas HSI, a PETA e a Leaping Bunny. Além disso, sites e publicações de organizações governamentais como o CONCEA e o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação também foram analisados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Métodos alternativos aos modelos animais

No processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento, após a seleção e identificação da molécula de interesse e formulação do medicamento, são necessários testes para analisar mais a fundo a segurança e eficácia dele. Os ensaios podem ser classificados em dois tipos, pré-clínicos e clínicos. De forma usual, os ensaios pré-clínicos de novos medicamentos são realizados utilizando métodos *in vitro*, ou seja, fora dos organismos vivos, e *in vivo*, como os testes em animais. Já os ensaios clínicos são divididos em 4 etapas e são feitos diretamente em humanos. Nesse trabalho, as metodologias de ensaio analisadas serão as pertencentes a etapa pré-clínica.

Considerando os ensaios *in vitro*, a metodologia tradicional é o uso de culturas de células humanas bidimensionais (2D, em monocamada) para testar, por exemplo, a toxicidade e eficácia de compostos. Entretanto, considerando que o corpo humano é um organismo complexo, com arquitetura multicelular e repleto de interfaces e interações, o modelo 2D não consegue representar aspectos cruciais da fisiologia humana da melhor forma, uma vez que apenas permite a demonstração de efeitos pontuais e locais.

Com relação aos métodos *in vivo*, tem-se os testes em animais. Apesar destes conseguirem representar melhor a interação entre tecidos e a complexidade do organismo, há diferenças interespecíficas fundamentais entre o corpo humano e o corpo de animais de laboratório

que precisam ser levadas em consideração, de maneira que o estudo da atividade de compostos em animais nem sempre é capaz de prever o que ocorreria no corpo humano. Além disso, as questões éticas e econômicas envolvidas também trazem debates acerca desse tipo de teste.

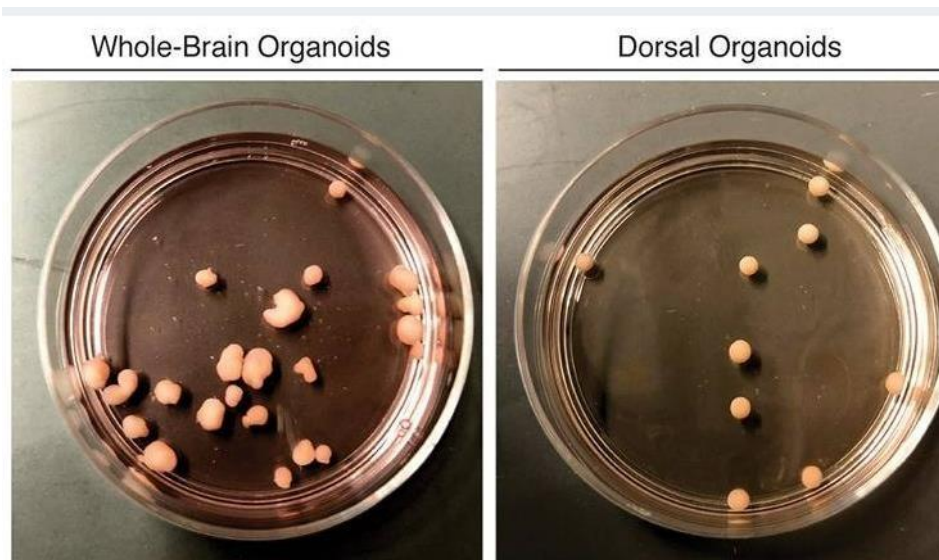
Sendo assim, o desenvolvimento de estruturas tridimensionais (3D) artificiais a partir de células humanas permite o estudo da ação de medicamentos ou do desenvolvimento de doenças de forma mais similar ao que ocorre no organismo humano *in vivo*, além de serem mais vantajosas considerando aspectos éticos e econômicos. As principais estruturas 3D utilizadas como método alternativo aos testes em animais são os organoides, órgãos em chips e tecidos vivos bioimpressos^{14,15}. A seguir elas serão apresentadas, explicadas, analisadas e exemplificadas na prática.

4.1.1 Organoides

Os denominados “Organoides” são estruturas 3D complexas, que possuem composição e características morfológicas similares a determinados órgãos, de maneira que sua arquitetura e função conseguem mimetizar o funcionamento *in vivo*. Seu tamanho pode variar da largura de um fio de cabelo até aproximadamente cinco milímetros. Nas últimas décadas, diferentes tecnologias já foram utilizadas para mimetizar diversos órgãos através de variados protocolos e metodologias, permitindo estudos como o da fisiologia, das doenças e de possíveis tratamentos para elas.¹⁶

Na figura 1 é possível observar organoides de cérebro inteiro e organoides do prosencéfalo dorsal em placas de petri resultantes de um estudo realizado por Velasco *et al*¹⁷, que tinha como objetivo a comparação entre diferentes protocolos para obtenção dos organoides e análise dos resultados. Foi possível observar que o protocolo utilizado na obtenção dos organoides de cérebro inteiro levou a formação de modelos mais heterogêneos, enquanto para o prosencéfalo dorsal, o resultado foi de modelos mais homogêneos.

Figura 1: Organoides de cérebro inteiro e prosencéfalo dorsal



Da esquerda para a direita: organoides de cérebro inteiro e organoides do prosencéfalo dorsal.

Fonte: Velasco *et al*, 2019.

Independentemente do uso, o desenvolvimento de organoides é feito atualmente utilizando células tronco ou progenitores celulares específicos daquele órgão, que se organizam de forma autônoma, ou seja, o sistema celular desordenado é capaz de se organizar através de mecanismos intrínsecos do próprio sistema. Isso é feito através de dois processos fundamentais: formação de padrões celulares e rearranjos morfológicos e genéticos. O primeiro processo envolve a diferenciação das células iniciais nos diferentes tipos celulares do tecido. Já o segundo processo está relacionado a reorganização arquitetônica do tecido após a diferenciação dos diferentes tipos celulares, considerando mudanças no formato celular, contração, movimentação e expansão celulares. Os diferentes protocolos para obtenção de organoides demonstram a importância na criação de um microambiente adequado com condições específicas para que as células possam se auto-organizar. Além disso, alguns autores já têm buscado novos protocolos em que seja possível controlar mais minuciosamente o crescimento da célula, gerando organoides mais homogêneos.¹⁸

Considerando o estudo do desenvolvimento de doenças e entendimento de possíveis mecanismos, os organoides possuem grande utilidade. Por exemplo, um organoide de estômago foi utilizado para análise de possíveis mecanismos de infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e da resposta celular a essa bactéria. Para o mesmo órgão, organoides já foram utilizados para modelar o desenvolvimento de tumores.¹⁹

No campo de planejamento de fármacos, os organoides também possuem diversos usos. Por exemplo, eles podem ser utilizados para a realização de “drug screening”, isto é, a análise inicial de uma biblioteca grande de moléculas para identificação de possíveis fármacos, que em seguida deverão passar por estudos mais aprofundados para ter sua eficácia comprovada. É o caso dos organoides de traqueia e brônquios que foram utilizados para análise de possíveis moléculas com atividade farmacológica contra a fibrose cística.²⁰

Outro uso interessante dos organoides é na medicina personalizada, uma vez que ele pode ser desenvolvido a partir de células tronco de determinado paciente conhecido, e então o mecanismo do desenvolvimento de doenças e a ação de possíveis tratamentos podem ser analisada de forma individualizada, considerando os aspectos genéticos daquele paciente.²¹

Nesse trabalho, foi usado o organoide do cérebro obtido através de células tronco pluripotentes induzidas de humanos utilizado no estudo de possíveis medicamentos contra o Zika vírus como exemplo para uma análise mais aprofundada. Além disso, também foi analisado o uso de um organoide de fígado para análise de hepatotoxicidade.

A respeito do organoide do cérebro, este tem sido utilizado para estudar a eficácia e toxicidade de moléculas que atuam no sistema nervoso central. Durante a embriogênese dos mamíferos, as células tronco neurais geram os diferentes tipos celulares presentes no cérebro, que se organizam em diversas camadas, levando a uma estrutura tridimensional final complexa. O uso de monocamadas de células em estruturas bidimensionais, portanto, não consegue mimetizar esse ambiente e as interações e sinalizações que ocorrem nele. Além disso, o

cérebro do mamífero é extremamente mais complexo do que o de outros animais, como os ratos. Dessa forma, o estudo do cérebro desses animais também não consegue mimetizar corretamente o cérebro humano. Sendo assim, os organoides de cérebro desenvolvidos utilizando células tronco entram como uma boa metodologia alternativa aos testes em animais, já que possuem uma estrutura tridimensional celular complexa que se assemelha ao cérebro humano.²²

Um estudo realizado por Zhou *et al*²² demonstrou o uso de um organoide de cérebro para fazer o “drug screening” de diversas moléculas e analisar sua eficácia em inibir a infecção pelo Zika vírus e, assim, obter sólidos candidatos para fármacos. O Zika vírus é transmitido pelo mosquito do gênero *Aedes* e é extremamente perigoso no caso de infecção de gestantes, pois pode levar ao desenvolvimento de microcefalia e outras má formações congênitas no feto. Atualmente, ainda não existem tratamentos disponíveis, sendo então de grande importância o estudo de potenciais moléculas que sejam capazes de evitar o desenvolvimento dessas condições no feto.²³

No estudo realizado, os autores selecionaram 1120 compostos que possuem sua segurança e biodisponibilidade comprovada. A ação dessas moléculas foi estudada utilizando células tronco infectadas pelo vírus. Dentre elas, o bromidrato de hipeastrina (“hippeastrine hydrobromide” ou HH em inglês) e o dicloridrato de amodiaquina dihidratado (“amodiaquine dihydrochloride dihydrate” ou AQ em inglês) demonstraram efetivamente inibir a infecção pelo vírus e bloquear o efeito de paralização de crescimento ou aumento da apoptose, o que poderia levar a microcefalia. Esses “hits”, ou seja, potenciais moléculas com ação farmacológicas, foram validados utilizando um modelo organoide de prosencéfalo fetal humano. O vírus foi inoculado nas células do organoide por 24 horas e em seguida, elas foram tratadas pelos compostos por 3 dias para analisar os efeitos de curta duração (após 4 dias, sendo inoculação por 24 horas + 3 dias de tratamento), e depois por mais 14 dias (somando 18 dias no total) para analisar os de longa. A análise dos resultados após os primeiros 4 dias demonstrou que o HH levou a diminuição da presença de células infectadas pelo vírus e

do nível do RNA do vírus no sobrenadante. Além disso, esse composto conseguiu reverter o fenômeno da redução de proliferação celular e aumento da presença de células apoptóticas. Já o AQ, apesar de suprimir a infecção do vírus, não demonstrou essa reversão. Esses resultados demonstram a possibilidade de utilização do organoide como forma de validação da possível ação farmacológica de moléculas identificadas previamente.

Outro uso interessante dos organoides é para análise da hepatotoxicidade de determinados compostos. Esse tipo de identificação é de grande importância, uma vez que a grande maioria das moléculas são metabolizadas no fígado. Os pesquisadores Lee *et al*²⁴ utilizaram um organoide de fígado para analisar a capacidade de determinados medicamentos (sertralina, amicacina e amiodarona) de induzir a fosfolipidose, ou seja, levar a formação de complexos fármaco-fosfolipídeos nos lisossomos que não podem ser degradados pelas enzimas fosfolipidases. Para avaliar a eficiência dos organoides, os autores fizeram um estudo comparativo com cultura de células hepáticas 2D.

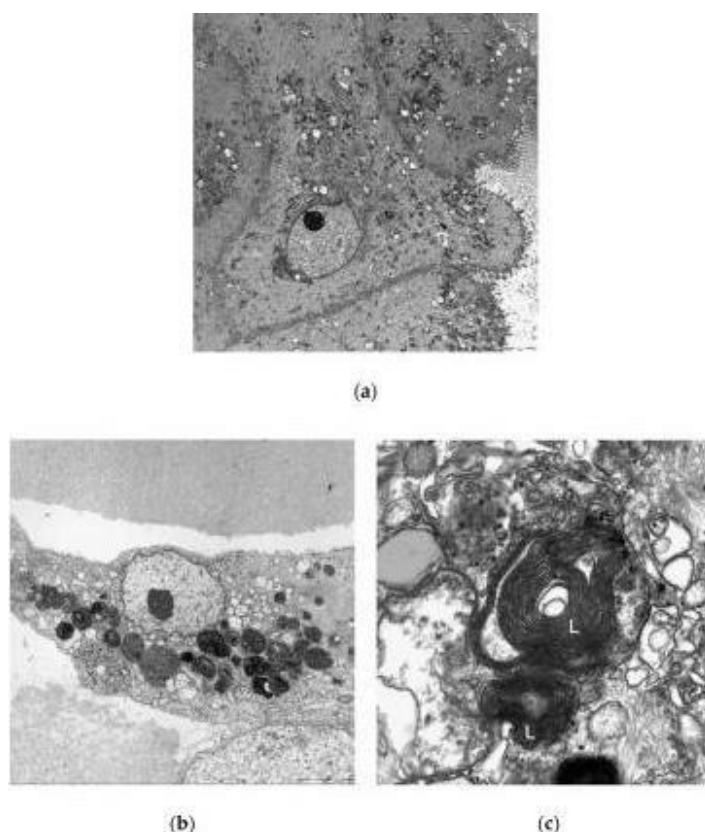
Antes de estudar a fosfolipidose em si, os autores fizeram ensaios para analisar a capacidade de cada método *in vitro* de mimetizar a arquitetura e o funcionamento do fígado. Os resultados demonstraram que os organoides que passaram por diferenciação celular demonstraram características mais similares aos hepatócitos primários do que as células em monocultura 2D. Por exemplo, a expressão de HNF4 α , um fator de transcrição hepático, foi mais forte nos organoides e o acúmulo de glicogênio também.

Com relação aos estudos dos impactos da fosfolipidose como resultado da ação dos medicamentos, os resultados demonstraram que a viabilidade das células hepáticas em cultura 2D foi bastante diferente entre um medicamento e outro, mas que de forma geral os medicamentos levaram a maior citotoxicidade, o que pode ser explicado pelo fato de que o crescimento em monocamada gera uma área maior de exposição. Já para os organoides, a diferença de viabilidade e a citotoxicidade foi menor. Isso pode ser explicado pela formação de

junções entre as células, o que diminui a área de exposição aos medicamentos.

Na avaliação morfológica celular após a inserção dos medicamentos no meio, os resultados demonstraram que eles levaram a formação de vacúolos resultantes da fosfolipidose no citoplasma de forma mais intensa nos organoides do que nas células em cultura 2D. Para confirmar esse fenômeno, os autores compararam organoides na presença e na ausência de amiodarona utilizando um microscópio de transmissão eletrônica, como demonstra a figura 2. No caso do organoide sob ação do medicamento (imagens b e c), foi possível observar a presença de corpos lamelares distintivos do fenômeno de fosfolipidose. Além disso, os autores verificaram a presença de junções celulares e canalículos biliares nos organoides, o que se assemelha ao que ocorre no corpo humano.

Figura 2: Comparação entre organoides com e sem tratamento com amiodarona



Os organoides presentes nas imagens a, b e c foram diferenciados por 12 dias e então tratados com um veículo controle (a) ou com 10 µm de amiodarona e

incubados por 48 horas (b e c, sendo que c apresenta um detalhamento maior). Os corpos lamelares são indicados por “L”. As imagens foram geradas com o uso do microscópio de transmissão eletrônica.

Fonte: Lee *et al*, 2020.

Os autores concluíram que o organoide é mais sensível a formação de fosfolipidose induzida pela presença de medicamentos e menos afetado pela citotoxicidade do que a monocamada de células 2D. Considerando a fosfolipidose como uma alteração celular crônica e não aguda gerada pela toxicidade, esses resultados apoiam a ideia de que o organoide tem a capacidade de melhor representar a hepatotoxicidade mediada por metabólitos que ocorre *in vivo* do que a monocamada de células 2D.

Levando em conta os estudos descritos juntamente com outros dados na literatura, é possível concluir que os organoides possuem boa capacidade em mimetizar as interações celulares e teciduais que ocorrem *in vivo*, independentemente dos órgãos que eles estão representando. Entretanto, há ainda limitações que devem ser superadas para que eles possam ser usados de forma mais abrangente e segura. Por exemplo, é difícil controlar perfeitamente o número de células e crescimento celular de cada organoide. Além disso, os organoides muitas vezes não apresentam todas as células relevantes daquele tecido para entender a resposta a determinado medicamento ou estímulo, como células do sistema imune, endoteliais, nervosas.

Todavia, apesar das limitações e considerando que cada vez mais elas serão superadas, o futuro dos organoides parece promissor. Por exemplo, já está sendo estudado o uso dessa tecnologia para transplante de órgãos e na área da medicina regenerativa²¹. Além disso, para entender melhor o mecanismo de doenças e assim, desenvolver melhores métodos de diagnósticos e melhores tratamentos. Com relação a farmacologia, há pesquisas no sentido de utilizar organoides como método de medicina personalizada (considerando que aquele organoide foi desenvolvido a partir de células de determinado indivíduo) para testar a eficácia e segurança de medicamentos de forma individualizada.²¹

4.1.2 Órgãos em Chips

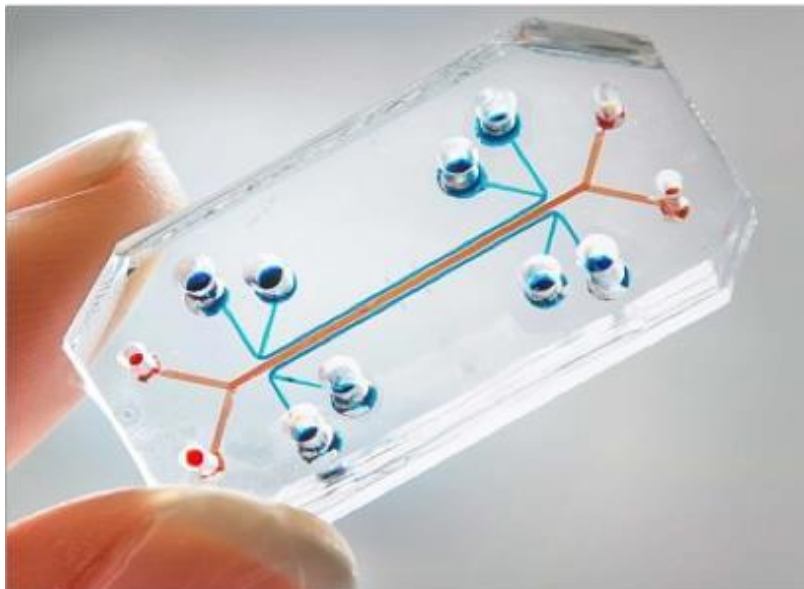
A tecnologia de “Órgãos em Chips” é baseada no desenvolvimento de um dispositivo micro fluídico que tem como objetivo mimetizar a estrutura, a função e a fisiologia de determinados tecidos. Eles podem variar em tamanho e formato, mas como estrutura geral, esses microdispositivos são compostos por um polímero flexível no seu interior que possui canais ocos em que passam volumes reduzidos de líquidos, alinhado com células humanas do órgão de interesse. Dessa forma, o dispositivo permite a análise do efeito de compostos sobre as células.^{25,26}

Existem diferentes tipos de dispositivos. Alguns mimetizam os órgãos apenas no nível celular, possuindo alinhado em seus canais determinadas células do órgão a ser estudado. Outros também possuem a capacidade de recriar aspectos mecânicos, como o movimento da respiração ou os movimentos peristálticos. Além disso, há dispositivos que possuem um canal com células endoteliais representando os vasos sanguíneos. Por fim, há estudos que demonstram a possibilidade de fluidicamente juntar dois ou mais chips para formar um “Corpo em Chips”, ou seja, sistemas de chips multi-órgãos com a capacidade de mimetizar a fisiologia do corpo humano como um todo.²⁷

A tecnologia dos “Órgãos em Chips” já foi utilizada para representar diferentes órgãos do corpo humano com diversos objetivos. O primeiro pesquisado e estudado foi o caso do pulmão. O pulmão em chip foi utilizado para demonstrar a capacidade dessa tecnologia em replicar o que ocorre *in vivo*. O estudo contou com a introdução de bactérias vivas ou nanopartículas (para simular a poluição), o que resultou em uma resposta inflamatória e o recrutamento de células imunes²⁸. Além disso, foi introduzido o medicamento contra câncer IL-2, que levou a uma resposta de edema pulmonar, como o que ocorre em alguns pacientes²⁹. Essas duas análises confirmaram a capacidade do chip de mimetizar os processos que ocorrem no corpo humano. Na figura 3 é possível observar uma representação do

pulmão em chip, desenvolvido por pesquisadores do Instituto Wyss de Harvard.²⁶

Figura 3: Pulmão em chip



Representação do pulmão em chip desenvolvido por pesquisadores do Instituto Wyss de Harvard. O canal endotelial ou vascular está representado de vermelho e o canal epitelial (que o ar passa) está representado em azul.

Fonte: Instituto Wyss, Harvard.

Alguns órgãos em chips já foram utilizados em estudos para analisar a toxicidade de medicamentos. Muitas vezes, são estudados medicamentos que já possuem sua toxicidade comprovada, mas o objetivo é demonstrar a capacidade da tecnologia dos órgãos em chips em mimetizar o que ocorre *in vivo*. É o caso do chip de coração, que foi usado na demonstração da diferença na segurança entre o pró-fármaco cardiotóxico terfenadina e seu metabólito não cardiotóxico fexofenadina³⁰. Outro uso na mesma área foi para análise dos efeitos tóxicos no miocárdio do medicamento para câncer doxorrubicina observados clinicamente. O chip de rim também possui estudos nessa mesma área. Por exemplo, pesquisadores realizaram um estudo em chips de túbulos renais para analisar o efeito do medicamento nefrotóxico ciclosporina A³². Outro estudo foi feito utilizando um chip de

glomérulo renal para análise da nefrotoxicidade do quimioterápico adriamicina.³³

Há também pesquisas no sentido de utilizar os chips para análise do desenvolvimento e mecanismo de doenças. É o caso, por exemplo, do chip de intestino delgado, que já foi utilizado para investigação do desenvolvimento e mecanismo de infecção pela *Escherichia Coli*³⁴. Um chip de cólon também foi utilizado para análise da infecção pela bactéria *Shigella sp.*³⁵

Nesse trabalho, será analisado mais profundamente o uso dos órgãos em chips para análise da farmacocinética e farmacodinâmica de compostos. Além disso, também será analisado o uso dessa tecnologia no estudo de um tumor pulmonar e possíveis tratamentos.

Na farmacologia, a pesquisa da farmacocinética/farmacodinâmica de compostos possui grande importância para concluir a segurança e eficácia dos fármacos. Com relação a farmacocinética, tem-se a análise de processos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos compostos, além do cálculo de parâmetros como concentração máxima e clearance renal. Já com relação a farmacodinâmica, tem-se a análise do mecanismo de ação do composto e, conseqüentemente, os efeitos terapêuticos e adversos. Uma pesquisa realizada por Herland *et al*³⁶ estudou a possibilidade do uso de um sistema de chips multi-órgãos contemplando o intestino, o fígado e o rim para analisar a farmacocinética da nicotina e da cisplatina. Para montar essa junção de diferentes chips, os autores passaram um líquido que seria um substituto para o sangue pelo canal composto por células que simulam o vaso sanguíneo e, com a ajuda de um sistema computacional, transferiram esse líquido de um chip para o outro. Ademais, os chips foram ligados a um reservatório arteriovenoso que simula a circulação sistêmica.

Além de desenhar esse “corpo em chip”, isso permitiu que eles pudessem pegar amostras de vários pontos do sistema. A partir disso, foi analisada a farmacocinética da nicotina e da cisplatina. Com relação a nicotina, além de estar presente no tabaco, ela pode também ser utilizada como fármaco para auxiliar nos sintomas da abstinência. Para simular sua administração por via oral, este composto foi infundido no

lúmen do chip do intestino, onde foi possível a análise de sua absorção; em seguida, passou pelo chip do fígado, onde foi analisado seu metabolismo e, por fim, pelo chip do rim, que permitiu a análise da excreção. Os dados obtidos *in vitro* foram comparados com os valores em estudos clínicos, o que está demonstrado na tabela 1 abaixo. Os resultados demonstraram que para o parâmetro de concentração máxima (C_{max}) e área sob a curva (AUC), os valores obtidos *in vivo* e *in vitro* foram bastante similares (0.052 $\mu\text{m} \pm 0.009$ e 0.050/0.054 μm , respectivamente para concentração máxima e 0.08 $\mu\text{m}.\text{hr} \pm 0.02$ e 0.062/0.073 $\mu\text{m}.\text{hr}$ respectivamente para AUC). Entretanto, para o parâmetro de tempo de meia vida para alcançar a concentração máxima, os valores diferiram consideravelmente (10.6 min *in vivo* e 20.45/19.9 min *in vitro*). Isso pode ser explicado pelo fato de o corpo humano ter uma circulação fechada contínua, enquanto o sistema multi-órgãos em chips necessita que o fluxo seja pausado periodicamente em pontos específicos para coletar amostras e repor o meio. Sendo assim, as limitações experimentais do sistema multi-órgãos em chips fazem com que o tempo *in vivo* que demora para atingir a concentração máxima da nicotina no sangue seja menor do que o *in vitro*. Entretanto, os autores foram capazes de superar esses problemas redesenhando a geometria dos órgãos em chips e do canal vascular de forma a diminuir a distância de difusão do líquido. Além disso, eles implementaram aspectos anatômicos que não estavam levando em conta anteriormente, como o fluxo sanguíneo para cada órgão especificamente e a perda de medicamento que acontece pelo acúmulo no tecido adiposo. Após as alterações, os resultados do tempo de meia vida para alcançar a concentração máxima se aproximaram dos valores obtidos *in vivo*.

Tabela 1: Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos da nicotina obtidos *in vivo* com os obtidos com o sistema de chips multi-órgãos

Nicotine PK Parameters (systemic compartment)	Human (Clinical data)*	In Silico Model(Multi-Organ Chips)
Nicotine Gum (4.2 mg)		
C_{max} (μM)	0.052 ± 0.009	0.050 ($\delta=3,8$ %, n.s.), 0.054 ($\delta=3,8$ %, n.s.)
t_{max} (min) (Range: minimum – maximum)	45 (19.8-90)	40.0 ($\delta=11,1$ %) 38.9 ($\delta=13,6$ %)
$t_{1/2, rise-phase}$ (min) ***	10.60	20.45 ($\delta=92,9$ %) 19.9 ($\delta=87,7$ %)
$t_{1/2, fell-phase}$ (min) ***	203	160 ($\delta=21,1$ %) 263 ($\delta=29,7$ %)
AUC($\mu M.hr$)**	0.08 ± 0.02	0.062 ($\delta=22,5$ %, $p=0.0007$) 0.073 ($\delta=8,75$ %, n.s.)

Comparativo entre os valores dos parâmetros farmacocinéticos obtidos utilizando o sistema multi-órgãos em chip e os obtidos em estudo com humanos.

*Os dados clínicos *in vivo* foram retirados de um estudo realizado por Digard et al³⁷.

** AUC foi computada para $t=0$ até $t=2$ horas para os estudos *in vivo* e *in vitro*

*** Estimado utilizando ajuste de curva que representa o valor *in vivo* (baseada nos valores clínicos disponíveis); o $t_{1/2}$ na fase de queda (fall-phase) está abaixo da janela de tempo da medida (assim portanto, as estimativas baseadas em ajustes de curva podem não ser confiáveis)

Fonte: Herland et al, 2020.

Já com relação a cisplatina, ela é um fármaco com ação antineoplásica utilizada principalmente como tratamento secundário em pacientes portadores de câncer de ovário metastático. No experimento, para simular a administração *in vivo* que deve ser feita por via intravenosa, ela foi infundida diretamente no reservatório. Além disso, o chip do intestino foi substituído por um da medula óssea, uma vez que esse fármaco possui toxicidade nesse órgão *in vivo*. Dessa maneira, foi possível analisar além da farmacocinética, aspectos da farmacodinâmica. De forma similar ao que ocorre *in vivo*, nesse

experimento foi possível observar a toxicidade mieloide, neutropenia e anemia, uma vez que houve redução na quantidade de células da medula óssea, neutrófilos e eritrócitos. Além disso, com relação aos parâmetros farmacocinéticos, de forma análoga a nicotina após otimização do sistema, os valores foram semelhantes aos obtidos em estudos clínicos.

Todos esses dados em conjunto demonstram a viabilidade do uso dos órgãos em chips para análise da farmacocinética/farmacodinâmica de compostos, após a superação de limitações do sistema. Os órgãos em chips podem também ser utilizados no estudo de doenças e tratamentos. Um estudo realizado por Zhiyun *et al*³⁸ teve como objetivo o desenvolvimento de um chip que mimetiza um tumor pulmonar para analisar a sensibilidade de diferentes fármacos. Os pesquisadores criaram um microambiente com a presença das células tumorais de pulmão (SPCA-1) e das células do estroma (HFL1), isto é, células encontradas no tecido conjuntivo, como fibroblastos, que podem contribuir para o crescimento do tumor. Eles compararam a eficiência do chip contendo a co-cultura de células com outro que apresentava uma monocultura de células SPCA-1, sem a presença das células estromais.

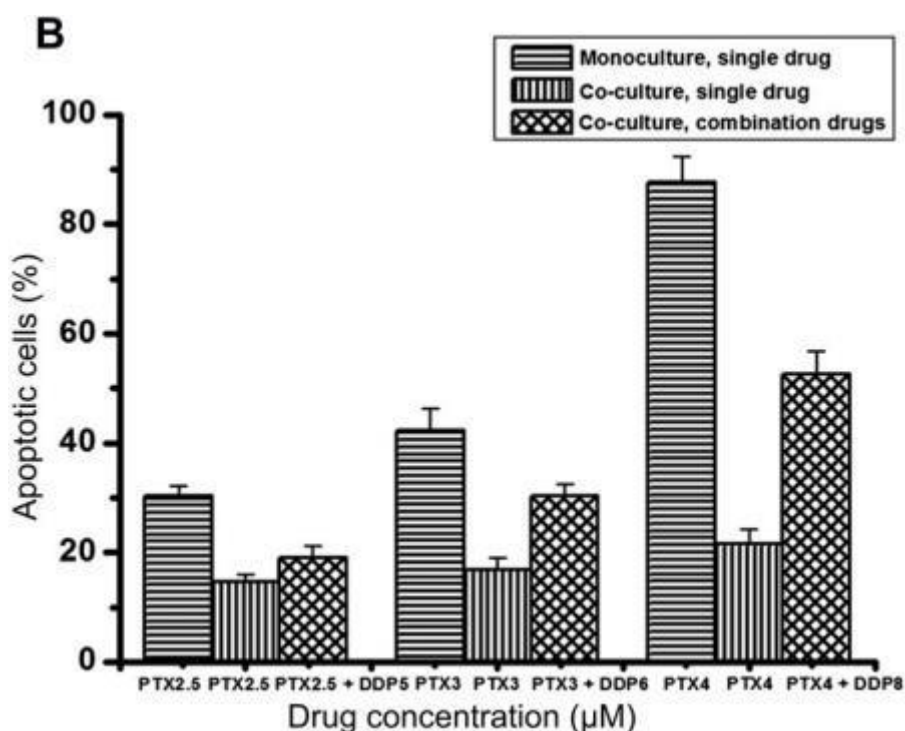
Primeiramente, o chip contendo a monocultura foi utilizado para testar a eficácia de diferentes fármacos antineoplásicos (em monoterapia e em terapia combinada). Além disso, os compostos foram infundidos em gradiente, de forma a testar diferentes dosagens. Dessa forma, as células foram divididas em 4 grupos: nos grupos 1-3, foram testadas fármacos com ação antineoplásica em monoterapia, sendo elas o gefitinibe, o paclitaxel e o GCB, em diferentes dosagens; no grupo 4, foi testada a terapia combinada, sendo infundido primeiramente o paclitaxel e 2 horas depois, a cisplatina (DDP), também em gradiente de concentração. Todas as moléculas foram inseridas juntamente com meio de cultura para simular o *in vivo*.

Os resultados dos esquemas de monoterapia demonstraram que os três medicamentos inibiram o crescimento das células cancerígenas de forma efetiva e de maneira dose dependente. Entre os três, o

gefitinibe foi o mais eficaz. Já com relação a terapia combinada, ela se mostrou ainda mais eficaz do que a monoterapia.

Em seguida, os pesquisadores testaram o paclitaxel nos chips contendo a co-cultura. Como mostra a figura 4, os resultados demonstraram que, para a mesma dosagem, a taxa de apoptose das células cancerígenas no caso da monocultura e monoterapia foi consideravelmente maior. Essa diferença entre a monocultura e a co-cultura de células demonstra que as células estromais afetam consideravelmente a sensibilidade do tumor ao medicamento. Entre as amostras em co-cultura, a que recebeu a terapia combinada teve taxa maior de apoptose, o que demonstra a maior eficácia dessa combinação.

Figura 4: Comparação da porcentagem de células apoptóticas entre os diferentes tumores pulmonares em chips



Comparação da porcentagem de células apoptóticas entre os esquemas de monocultura e monoterapia, co-cultura e monoterapia e co-cultura e terapia combinada, considerando gradiente de concentração. PTX se refere ao paclitaxel.

Fonte: Zhiyun *et al*, 2013.

Considerando os resultados obtidos com o uso dos órgãos em chips na pesquisa no ramo farmacêutico, é possível concluir que eles são um método alternativo aos testes em animais extremamente promissor e bastante eficaz. Entretanto, eles possuem algumas limitações. Por exemplo, o material mais utilizado como base do órgão em chip, o dimetil polissiloxano, tem a capacidade de absorver algumas moléculas hidrofóbicas pequenas, o que pode afetar a eficácia e toxicidade de solventes. Assim, é necessário identificar outros materiais possíveis de serem utilizados, os quais devem ser baratos e de fácil descarte, para que essa tecnologia possa ser difundida.

A tecnologia dos órgãos em chips está sendo pesquisada e melhorada e muitos autores já tentaram escrever sobre como seria o futuro dessa técnica. A principal ideia seria o desenvolvimento de um “humano em chip”, integrando diversos órgãos em um único chip que mimetizasse todo o funcionamento do corpo. Dessa forma, seria possível estudar como compostos interagem com diferentes tecidos e as relações de causa e consequência, além de estudar o desenvolvimento de doenças sistêmicas e da metástase, por exemplo.^{25,27}

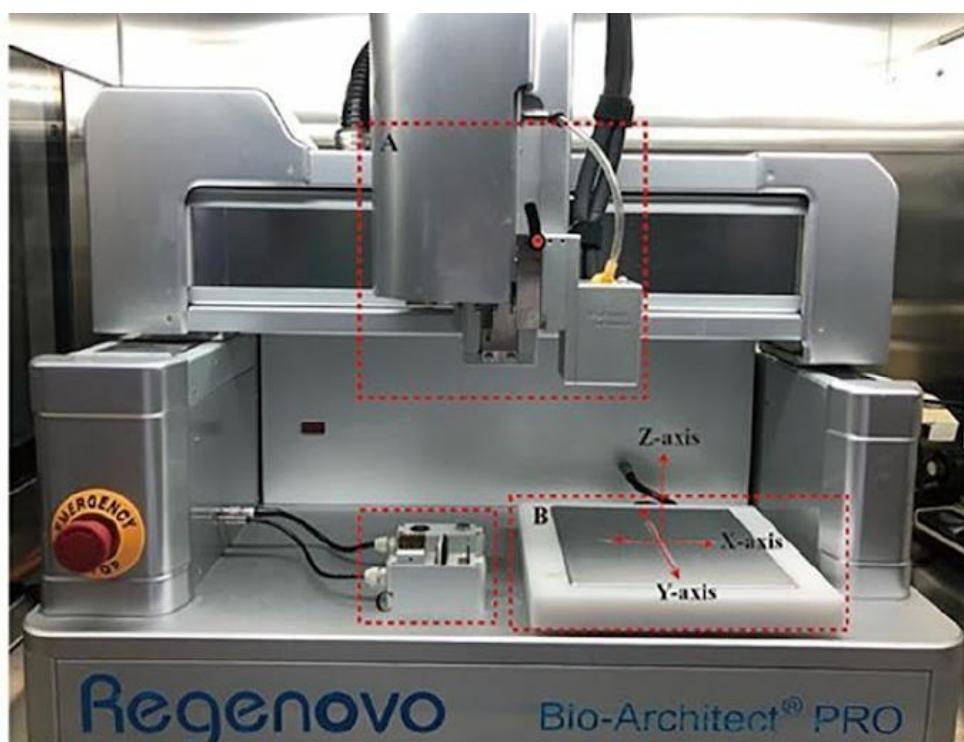
4.1.3 Tecidos vivos bioimpressos

De forma geral, a técnica de impressão 3D consiste na transformação de um arquivo digital, desenhado e presente virtualmente em um objeto 3D, a partir do uso de materiais como plásticos, pós, metais, entre outros. Existem diferentes metodologias para a impressão em três dimensões, mas todas se baseiam na concepção de que a impressora funciona através de um método de formação de camadas, ou seja, ela imprime camada por camada até chegar no objeto desejado. Na área da saúde e na bioimpressão de tecidos vivos, o material base utilizada é a biotinta, que é composta por moléculas de hidrogel, células vivas e diversos compostos que permitem a comunicação entre as células e seu crescimento.^{39,40}

Dentre as técnicas de bioimpressão 3D, a mais utilizada é a de extrusão. Nela, a biotinta é carregada em uma câmara na impressora e

empurrada para dentro de um bocal que está conectado a uma cabeça da impressora. A partir disso, o bocal vai liberando a tinta de forma a produzir filamentos contínuos e finos. A impressão pode ser realizada em uma superfície ou em um banho e ela é rápida (por exemplo, para produzir um menisco demora menos de 30 minutos). Após a impressão, alguns filamentos estão prontos e outros podem precisar de radiação ultra-violeta ou outros processos químicos ou físicos para estabilizar a estrutura. Se for bem-sucedida, as células vão começar a se reproduzir como em um tecido *in vivo*^{40,41}. Na figura 5, é possível ver uma impressora que funciona a base da técnica de extrusão.⁴²

Figura 5: Impressora 3D com funcionamento a base da técnica de extrusão

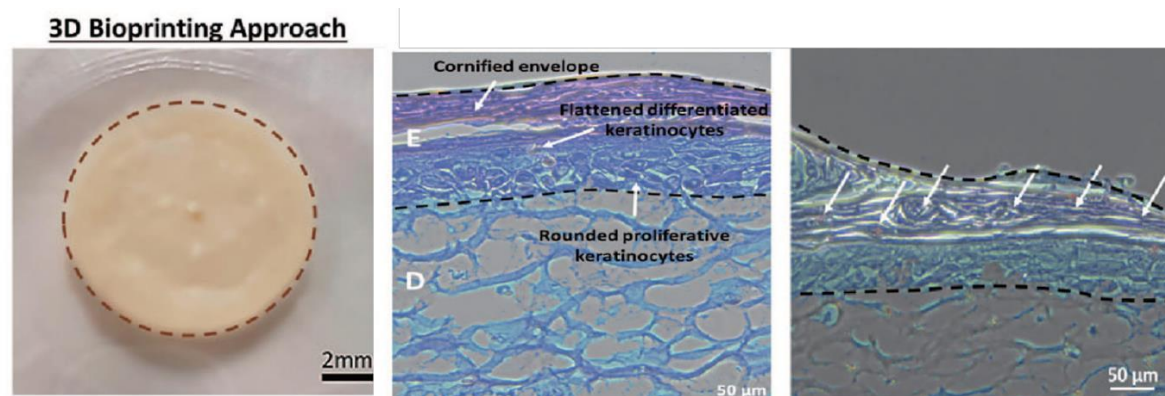


Impressora 3D que funciona a base do método de extrusão. A linha pontilhada “A” é o dispositivo de extrusão, a “B” é a plataforma de impressora e a “C” representa o dispositivo de limpeza e correção, em que o de limpeza está na frente e tem a função principal de limpar as seringas e o de correção atrás.

Fonte: Weng et al, 2021.

Na área médica, a técnica de bioimpressão 3D de tecidos vivos possui aplicações interessantes. Um dos principais exemplos é na replicação da epiderme humana. Considerando o fato de que essa camada da pele possui uma estrutura multicelular complexa, o uso da tecnologia de bioimpressão 3D permite a construção de um tecido que representa de forma acurada o humano. Sendo assim, a epiderme bioimpressa pode ser utilizada como substituição em casos de pacientes com queimaduras graves, para pesquisa das propriedades da pele (como permeabilidade) e para realização de testes de cosméticos (que por não serem absorvidos, atuam apenas nessa camada da pele)⁴². Um extrato de pele bioimpressa pode ser visualizado na figura 6.⁴³

Figura 6: Epiderme obtida pela técnica de bioimpressão 3D



Imagens representativas de construções de pele humana pigmentadas fabricadas por meio de bioimpressão 3D. A pele humana pigmentada bioimpressa em 3D é construída com pigmentação uniforme da pele, a área pigmentada é delimitada pela linha pontilhada marrom na imagem mais à esquerda. A imagem do meio é representativa da coloração H&E de construções de pele humana pigmentadas em 3D. A região epidérmica é indicada por E e a região dérmica é indicada por D. A imagem mais à direita é representativa da coloração de Fontana Masson de construções de pele humana pigmentadas em 3D. barra de. As setas estão indicando a distribuição dos grânulos de melanina na região epidérmica das matrizes 3D (coloração preto-acastanhada).

Fonte: Weng *et al*, 2021.

Um estudo realizado por Liu *et al*⁴⁴ utilizou da técnica da bioimpressão de pele para gerar modelos da doença de dermatite atópica com o objetivo de estudar essa condição e possíveis tratamentos para ela.

A dermatite atópica é uma doença inflamatória complexa. Durante o início e a progressão, células imunes do tipo Th2 são ativadas pela presença de determinado alérgeno e levam a ativação subsequente de vias de sinalização inflamatória a partir da secreção de citocinas pró inflamatórias. O feedback positivo das vias leva a produção exacerbada desses tipos de citocinas na condição crônica. Algumas das citocinas envolvidas incluem a IL-13 e IL-4 e uma das principais vias de sinalização envolvidas é a JAK-STAT. Nela, ao ocorrer ligação da citocina pró inflamatória no receptor, as quinases JAK1 e JAK3 são ativadas e fosforilam o fator de transcrição STAT6, que vai induzir a transcrição de diversos genes relacionados a ação dessa citocina. Diferentes estudos atualmente consideram essa via como o melhor alvo terapêutico para a doença, desenvolvendo e testando medicamentos que a inibam para intervir na progressão da dermatite atópica e resgatar a função barreira da pele.

No estudo, os autores produziram três tipos de tecidos da pele, sendo eles a epiderme humana reconstruída (RhE), a pele de espessura total não vascularizada (epiderme e derme; FTS) e vascularizada (epiderme, derme e rede vascular. VFTS) e testaram os três como forma de avaliar o desenvolvimento da doença e possíveis tratamentos.

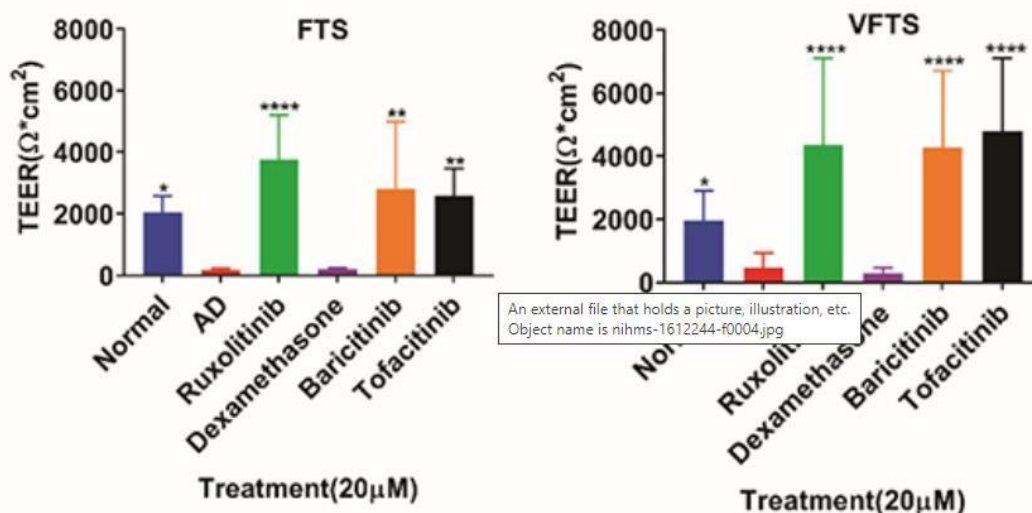
Os tecidos bioimpressos foram tratados com a citocina pró inflamatória IL-4, que induz a formação do fenótipo clássico da dermatite atópica: espaços celulares semelhantes a espongiose, hiperplasia epitelial e diferenciação celular prejudicada. Com o objetivo de analisar a capacidade de cada tecido de representar a doença, foi utilizada uma medida de resistência transepitelial de alto rendimento (TEER) para avaliar a função de barreira dos equivalentes de pele. Os resultados demonstraram que os valores diminuíram drasticamente após o tratamento com IL-4 para a FTS e a VFTS, mas não se alteraram para a RhE. Além disso, um painel de 21 citocinas e quimiocinas foi medido,

mostrando que a citocina IL-1 α e as quimiocinas eotaxina e CCL17 aumentaram significativamente nos tecidos FTS E VFTS tratados com IL-4 comparados ao não tratados. Essa citocina e essas quimiocinas já foram reportadas como aumentadas nos pacientes com dermatite atópica. Já na RhE, não foi observado aumento na produção após tratamento com IL-4. Esses resultados trazem o questionamento se tecidos bioimpressos de pele simplificada são modelos relevantes para análise de doenças inflamatórias e seus tratamentos e demonstram a importância da incorporação da camada da derme na pele bioimpressa para criar um modelo mais similar ao fisiológico.

Em seguida, os autores usaram os modelos para análise de tratamentos da doença. O alvo terapêutico em questão é a via de sinalização JAK-STAT, que é ativada em pacientes com dermatite atópica pela presença de citocinas pró inflamatórias e leva a produção de mais citocinas desse tipo, contribuindo para a inflamação exacerbada. Foram selecionados para análise três inibidores de JAK em estudos clínicos, sendo eles o ruxolitinibe, o baricitnibe e o tofacitinibe. Os resultados mostraram que para todos os tratamentos, houve uma restauração da morfologia epidermal, da função barreira e um aumento da expressão de proteínas de diferenciação celular, de junções celulares e junção epiderme-derme nos tecidos FTS e VFTS. Ademais, as citocinas que estavam aumentadas nos tecidos com a doença foram diminuídas com os três tratamentos.

Além dos inibidores de JAK, a ação do anti-inflamatório dexametasona também foi analisada. Considerando a restauração da função barreira da pele, os resultados mostraram que os inibidores de JAK tiveram sucesso em retomar o fenótipo pré-tratamento com IL-4, sendo que o mais eficaz foi o ruxolitinibe. Entretanto, no tecido tratado com dexametasona isso não ocorreu. Além disso, comparando os tecidos FTS e VFTS, para o VFTS essa restauração com os medicamentos inibidores de JAK foi maior. Isso está representado na figura 7.

Figura 7: Comparativo da capacidade de restauração da função barreira da pele para cada medicamento estudado, considerando os dois tipos de pele bioimpressa estudados



Representação gráfica da restauração da função barreira da pele (TEER) nos tecidos bioimpressos considerando o vascularizado (VFTS) e não vascularizado (FTS) após tratamento com inibidores de JAK (ruxolitinibe, baricitinibe e tofacitinibe) e do anti-inflamatório dexametasona

Fonte: Liu *et al*, 2020

Outra análise realizada no estudo foi a do fenótipo vascular induzido pela IL-4 no tecido VFTS. Houve redução da angiogênese, mas a rede vascular se manteve estável nas estruturas impressas. Nos tecidos tratados com os medicamentos inibidores do JAK e a dexametasona, não houve restauração na angiogênese e os inibidores do JAK levaram a uma diminuição na rede vascular nas estruturas impressas e na produção de fatores de angiogênese como VEGF-C, VEGF-D, ICAM-1, VCAM-1 e VEGF-A. Isso demonstra que os inibidores de JAK possuem um efeito anti-angiogênico e um potencial efeito adverso de perturbar a estabilidade e viabilidade da rede vascular dermal.

A partir de todos esses resultados, é possível concluir que a pele de espessura total bioimpressa foi capaz de mimetizar o que ocorre na

dermatite atópica *in vivo*. Além disso, os tratamentos que já estão em estudos clínicos tiveram resultados positivos nesse estudo, corroborando com outros estudos disponíveis na literatura.

Além do uso da técnica de bioimpressão 3D para análise da pele, que é amplamente utilizada, essa metodologia possui diversas outras aplicações. Por exemplo, diversos autores já realizaram estudos acerca da bioimpressão de tecido hepático para análise da toxicidade medicamentosa. É o caso do estudo realizado por Nguyen *et al*⁴⁵ que analisaram a possível toxicidade causada pelos medicamentos mesilato de trovafloxacino e levofloxacino sobre o fígado.

Os autores utilizaram hepatócitos humanos primários criopreservados, células estreladas hepáticas e células endoteliais de veia umbilical humana como base das biotintas usadas na bioimpressão. Para analisar a qualidade e a viabilidade do uso desse tecido, foram feitas diferentes caracterizações. Primeiramente, os autores realizaram uma caracterização histológica. Os resultados demonstraram que o tecido hepático bioimpresso, ao longo de alguns dias, foi capaz de formar estruturas tridimensionais estáveis, sem a presença de necrose. Além disso, houve áreas de deposição de colágeno na região não parenquimal do tecido, expressão da proteína de junção intercelular e-caderina, formação de rede de células endoteliais com a presença de lúmen, evidência de um estado de quiescência com o microambiente multicelular tridimensional e presença de armazenamento de lipídeos e glicogênio. Todos esses itens demonstram a similaridade entre o tecido bioimpresso e o tecido hepático *in vivo*.

Além disso, foi realizada uma caracterização bioquímica durante 28 dias. Nela, foi analisada os níveis de ATP, albumina e de atividade do citocromo p450. Com relação ao ATP, após o dia 21 os níveis aumentaram, caracterizando uma atividade metabólica do tecido bioimpresso e contínua proliferação dos componentes não parenquimais. Com relação a albumina, que é um biomarcador para a maturação dos hepatócitos e um indicador geral da capacidade de produção de proteína, os níveis aumentaram até o dia 14 e depois atingiram um platô até o dia 21. De acordo com a literatura, esses valores discordam do que

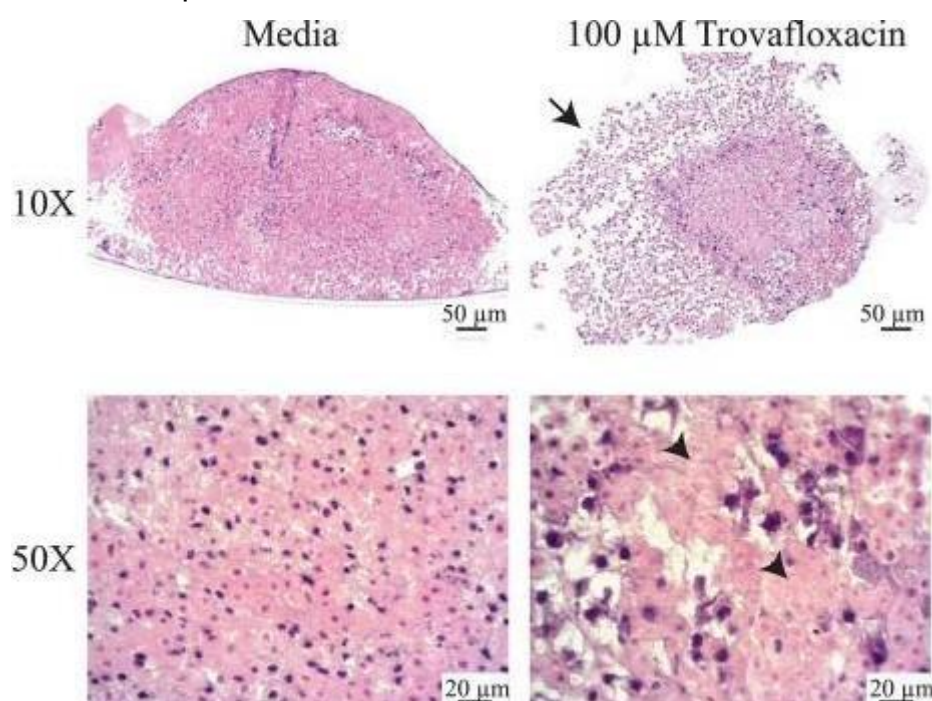
a cultura simples 2D de hepatócitos demonstra (diminuição na produção dos dois até o dia 14 e níveis baixíssimos de albumina após esse período). Esses resultados vão de acordo com os encontrados na análise histológica, demonstrando a melhor capacidade do tecido tridimensional bioimpresso de demonstrar o que ocorre *in vivo*.

Por fim, foi feita a análise de RNA mensageiro das enzimas do citocromo p450. Os resultados demonstraram que há expressão basal de enzimas CYP importantes durante os 28 dias de cultura. Para verificar a atividade enzimática, foi investigada a habilidade do tecido de metabolizar o midazolam (substrato da CYP3A4) para 4-hidroximidazolam. Após as 4 semanas, houve boa metabolização do substrato. Além disso, houve um aumento da atividade metabólica da CYP3A4 quando exposta a rifampicina, que é um indutor dessa enzima. Esses resultados contribuem para demonstrar a boa funcionalidade do tecido bioimpresso em mimetizar o que ocorre *in vivo* e responder a estímulos.

Após a caracterização, os autores passaram para a avaliação da toxicidade dos compostos mesilato de trovafloxacino e do levofloxacino. O mesilato de trovafloxacino é um antibiótico que foi retirado do mercado nos Estados Unidos e na Europa por estar associados a casos de falência hepática e morte em uma pequena proporção de pacientes. É interessante notar que esse potencial hepatotóxico não havia sido notado nos estudos pré-clínicos. O exato mecanismo da toxicidade é desconhecido, mas é sabido que possui relação com uma reação inflamatória. Sendo assim, os autores avaliaram se seria possível detectar toxicidade após o tratamento do tecido bioimpresso com esse medicamento em doses que previamente não demonstraram esse efeito em culturas 2D e comparar esses efeitos aos do levofloxacino, composto não tóxico relacionado. Os resultados mostraram que o mesilato de trovafloxacino levou a uma diminuição significativa nos níveis de ATP e albumina, sendo que para a albumina o efeito foi mais pronunciado (mais que 50% de diminuição mesmo em doses sub-micromolares). O levofloxacino levou a diminuição nos níveis de albumina apenas para a maior dose testada (100 μ m) e não levou a mudanças na produção de

ATP. Em oposição a isso, nos testes em cultura 2D, apenas a dose máxima (100 μM) de mesilato de trovafloxacino apresentou toxicidade. Isso demonstra a superioridade do tecido tridimensional bioimpresso em relação a cultura de células bidimensional em prever hepatotoxicidade clínica. Além disso, foi possível observar com detalhes os efeitos histológicos do mesilato de trovafloxacino, que estão demonstrados na figura 8.

Figura 8: Efeitos histológicos do mesilato de trovafloxacino sobre o tecido bioimpresso



Efeitos histológicos do mesilato de trovafloxacino em tecidos hepáticos bioimpressos em 3D. Coloração H&E de um tecido hepático 3D não tratado (Media) ou 100 μM tratado com mesilato de trovafloxacino, com seções transversais capturadas em ampliação de 10X ou 50X para visualizar características salientes. A análise histológica mostra perda de adesão celular (seta) e aumento da necrose de hepatócitos (setas) em tecidos tratados com mesilato de trovafloxacino.

Fonte: Nguyen *et al*, 2016

Assim, como mostram os resultados obtidos corroborados com a figura 8, o tecido bioimpresso 3D teve uma boa capacidade de mimetizar o que ocorre *in vivo* e prever a toxicidade medicamentosa. Sendo assim,

a perspectiva futura é que o uso dessa metodologia com esse objetivo ocorra de forma mais generalizada e tenha capacidade cada vez maior de levar a aprovação de medicamentos seguros e eficazes.

A técnica de bioimpressão 3D é muito promissora dentro do universo da medicina regenerativa, uma vez que, apesar de atualmente ser realizada apenas a impressão de tecidos mais simples, essa tecnologia está caminhando para um futuro que permite a impressão de órgãos complexos e uso deles para transplantes por exemplo. Além disso, a bioimpressão 3D possui um papel importante na medicina personalizada, uma vez que a origem das células pode ser de um paciente específico, de forma a se produzir um tecido individualizado para ele, diminuindo a chance de rejeição. Entretanto, ainda existem alguns desafios envolvendo essa metodologia que precisam ser superados. Por exemplo, na bioimpressão de tecidos maiores, a principal questão é o suprimento de oxigênio e nutrientes. Para auxiliar com isso, as pesquisas estão caminhando no sentido de inserir vasos sanguíneos nos tecidos bioimpressos.^{39,40}

5. CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, é possível observar uma crescente conscientização a respeito do uso de animais para experimentação tanto na indústria cosmética quanto na farmacêutica. Isso é evidenciado pelo surgimento de ONGs e instituições governamentais que visam regulamentar e supervisionar os testes realizados em animais. Apesar de recentemente proibido em diversos países para a indústria cosmética, incluindo o Brasil, na indústria farmacêutica eles ainda são utilizados. Entretanto, há uma busca ativa para o desenvolvimento de metodologias alternativas que possam diminuir o uso dos animais e no futuro possivelmente chegar a substituí-los.

Nesse sentido, os modelos 3D têm se mostrado alternativas viáveis e seguras para serem utilizadas no desenvolvimento de fármacos e em ensaios pré-clínicos de novos medicamentos, visando avaliar a segurança e eficácia de compostos. Eles podem ser divididos principalmente em três categorias que estão sendo mais profundamente

estudadas, analisadas e avaliadas, sendo elas os organoides, os órgãos em chips e o uso da técnica de bioimpressão para obtenção de tecidos vivos. Cada técnica apresenta suas particularidades, mas de forma geral elas são capazes de mimetizar o funcionamento dos órgãos e tecidos *in vivo*, permitindo o estudo de doenças e da ação de medicamentos.

O futuro para as metodologias alternativas ao uso de modelos animais no desenvolvimento de fármacos e ensaios pré-clínicos de novos medicamentos parece promissor. Muitos estudos estão focando, por exemplo, no uso dessas técnicas para a medicina personalizada ou transplante de órgãos. Sendo assim, a pesquisa e otimização desse tipo de tecnologia, além de permitir a redução no uso de testes em animais, é uma oportunidade para contribuir com o avanço da ciência.

6. BIBLIOGRAFIA

1. HAJAR, Rachel, Animal testing and medicine, **Heart Views**, v. 12, n. 1, p. 42, 2011.
2. ALSTRUP, A.K.O. Animal Research in the Age of Antiquity - Danish 3R-Center. Disponível em: <<https://en.3rcenter.dk/laboratory-animals/history-of-animal-testing/animal-research-in-the-age-of-antiquity#:~:text=Both%20the%20philosopher%20Aristotle%20>>. Acesso em: 1 de março de 2023.
3. Humane Society International. Disponível em: <<https://www.hsi.org/>>. Acesso em: 1 de março de 2023.
4. Peta. Disponível em: <<https://www.peta.org/>>. Acesso em: 1 de março de 2023.
5. Leaping Bunny. Disponível em: <<https://www.leapingbunny.org/>>. Acesso em: 1 de março de 2023.
6. Cruelty Free International. Disponível em: <<https://crueltyfreeinternational.org>>. Acesso em: 1 de março de 2023.
7. BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação/Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução N° 58, de 24 de fevereiro de 2023. Diário Oficial da União (DOU), ed. 41, seção 1, p. 8, fevereiro 2023. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-58-de-24-de-fevereiro-de-2023-466792333>>. Acesso em: 1 de março de 2023.

8. EU bans animal-tested cosmetics. BBC News, 2013. Disponível em: <<https://www.bbc.com/news/world-europe-21740745>>. Acesso em: 1 mar. 2023.
9. SINGH, Snehal. Cruelty-Free Cosmetics Market Research Report. [s.l.]: Market Research Future, 2023. Disponível em: <<https://www.marketresearchfuture.com/reports/cruelty-free-cosmetics-market-3825>>. Acesso em 2 de março de 2023.
10. SURYA N , VITIKA V. Non-Animal Alternative Testing Market Research, 2030. [s.l.]: Allied Market Research, 2022. Acesso em 2 de março de 2023. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/non-animal-alternative-testing-market-A25675#:~:text=The%20global%20non%2Danimal%20alternative,13.5%25%20from%202022%20to%202030>. Acesso em 2 de março de 2023.
11. BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea>>. Acesso em 1 de março de 2023
12. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. The 3Rs | NC3Rs. Disponível em: <<https://nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>>. Acesso em: 1 mar. 2023.
13. SONALI K. Doke, SHASHIKANT C. Dhawale, Alternatives to animal testing: A review, **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3 p. 223-229, 2013.
14. Landsiedel, R., Maria-Engler, S.S., Schäfer-Korting, M; **Organotypic Models in Drug Development**, 1. ed. Springer, 2021.
15. WANG, Hongbing et al. 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. **Clinical and Translational Science**, v. 14, n. 5, p. 1659-1680, 2021.
16. KIM, J., KOO, BK. & KNOBLICH, J.A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 571–584, 2020.
17. VELASCO, Silvia et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. **Nature**, v. 570, p. 523–527, 2019.

18. ROSSI, G., MANFRIN, A., LUTOLF, M.P. Progress and potential in organoid research. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, p. 671-687, 2018
19. BARTFIELD, S. et al. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. **American Gastroenterology Association**, v. 148, n. 1, p. 126–136, 2015.
20. WONG, Amy P. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 876–882, 2012.
21. ZHAO, Zixuan et al. Organoids. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 2, n. 94, 2022.
22. ZHOU, Ting et al. High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 2, 2017.
23. Zika virus. World Health Organization (WHO). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus?gclid=CjwKCAjw_YShBhAiEiwAMomsEKe8xhPgjNyqz8kHFqXNJ2ARyQP5y9CIICdOrX7DrnbxoasfVI2qKhoCT4cQAvD_BwE>. Acesso em: 5 mar. 2023.
24. LEE, Ji-Young, et al. Use of 3D Human Liver Organoids to Predict Drug-Induced Phospholipidosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, 2020.
25. BHATIA, S.N, INGBER, D.E. Microfluidic organs-on-chips. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 760–772, 2014.
26. WYSS INSTITUTE. Human Organs-on-Chips. Disponível em: <<https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>>. Acesso em: 2 mar. 2023.
27. INGBER, D.E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. **Nature Reviews Genetics** v. 23, p. 467–491, 2022.
28. HUH, Dungeon et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. **Science**. v. 328, n. 5986, p. 1662–1668, 2010.

29. HUH, Dungeon et al. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 159, p. 159ra147, 2012.
30. KUJALA, Ville J. et al. Laminar ventricular myocardium on a microelectrode array-based chip. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 20, p:3534–3543, 2016.
31. ZHANG, Yu Shrike et al. Bioprinting 3D microfibrous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. **Biomaterials**, v. 110, p. 45-59, 2016.
32. HOMAN, Kimberly A et al. Bioprinting of 3D Convuluted Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 34845, 2016.
33. MUSAH, Samira et al. Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip. **Nature Biomedical Engineering**, v. 1, n. 0069, 2017
34. TOVAGLIERI, Alessio et al. Species-specific enhancement of enterohemorrhagic E. coli pathogenesis mediated by microbiome metabolites. *Microbiome*. v. 7, n. 43, 2019
35. GRASSART, Alexandre et al. Bioengineered human organ-on-chip reveals intestinal microenvironment and mechanical forces impacting *Shigella* infection. **Cell Host & Microbe**, v. 26, n. 3, p. 435-444.e4, 2019.
36. HERLAND, Anna et al. Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs via fluidically coupled vascularized organ chips. **Nature Biomedical Engineering**, v. 4, n. 4 p. 421-436, 2020.
37. DIGARD, H., PROCTOR, C., KULASEKARAN, A., MALMQVIST U., RICHTER, A. Determination of nicotine absorption from multiple tobacco products and nicotine gum. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 15, n. 1, p. 255-261, 2013.
38. ZHIYUN, Xu et al. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer, **Biomaterials**, v. 34, n. 16, p. 4109-4117, 2013

39. GAO G., AHN M., CHO W.W., KIM B.S, CHO D.W. 3D Printing of Pharmaceutical Application: Drug Screening and Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1373, 2021.
40. PERSAUD, A., MAUS, A., STRAIT, L., ZHU, D. 3D Bioprinting with Live Cells. **Engineered Regeneration**, v. 3, n. 3, p. 292-309, 2022.
41. TED-ED. How to 3D print human tissue - Taneka Jones. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=uHbn7wLN_3k>.
42. BAGATIN, J.T; CAMARENA, D.E.M, *et al.* Bioprinted and manual human epidermis production: A compared performance for skin irritation tests. **Bioprinting**, v. 19, n 00251, 2023.
43. WENG, Tingting *et al.* 3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives. **Journal of Tissue Engineering**, v. 12, 2021.
44. LIU, Xue *et al.* A biofabricated vascularized skin model of atopic dermatitis for preclinical studies. **Biofabrication**, v. 12, n. 3, 2020.
45. NGUYEN, Debora G. *et al.* Bioprinted 3D Primary Liver Tissues Allow Assessment of Organ-Level Response to Clinical Drug Induced Toxicity In Vitro. **Plos One**, v. 11, 2016.

2023/05/19

Handwritten signature in black ink, appearing to read "Gabriel".

Data e assinatura do aluno(a)

2023/05/19

Handwritten signature in blue ink, appearing to read "Silvy".

Silvy Stuchi Maria-Engler

Data e assinatura do orientador(a)