



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CARLY KATHLEEN PIRES MOREIRA

**TRIAGEM DE ANÁLOGOS DE 1,4-DIHIDROPIRIDINA EM
CONDIÇÕES DE CULTURA TUMORAL EM MATRIZ CELLFATE®**

FLORIANÓPOLIS/SC

2021

Carly Kathleen Pires Moreira

**TRIAGEM DE ANÁLOGOS DE 1,4-DIHDROPIRIDINA EM CONDIÇÕES DE CULTURA
TUMORAL EM MATRIZ CELLFATE®**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título em mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Coorientadora: Dr^a. Karina Cesca

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moreira, Carly Kathleen Pires

Triagem de análogos de 1,4-dihidropiridina em condições de cultura tumoral em matriz Cellfate® / Carly Kathleen Pires Moreira ; orientador, Luismar Marques Porto, coorientadora, Karina Cesca, 2022.

82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Cultivo celular em plataforma 3D. 3. Farmacologia. 4. Celulose Bacteriana. I. Porto, Luismar Marques. II. Cesca, Karina. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Carly Kathleen Pires Moreira

**Triagem de análogos de 1,4-dihidropiridina em condições de cultura tumoral em matriz
Cellfate®**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Débora de Oliveira, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Domingos Lusitâneo Pier Macuvele, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Fernanda Vieira Berti, Dra.
Biocelltis Biotecnologia S.A

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Profa. Dra. Débora de Oliveira
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Florianópolis, 19 de Outubro de 2021.

Dedico este trabalho a toda minha rede de suporte pessoal e profissional, sem a qual não teria sido possível finalizá-lo. E a todos que sofrem ou sofreram algum transtorno mental durante a pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Gratidão à Fonte criadora e mantenedora de tudo o que há por tudo o que fez e faz em mim, por mim, para mim e através de mim. Gratidão os meus pais, Arliene e Orivaldo, pela amizade, constante e imensurável apoio e por unirem as forças e me motivarem a alcançar o que tenho almejado. Por lutarem comigo, respeitando e ensinando-me a respeitar o meu tempo, para eu não desistir diante dos inúmeros percalços. Por terem galgado esse caminho junto a mim e, posso até dizer, carregando-me em momentos que eu sentia que não iria mais conseguir.

Gratidão às minhas tias Arlene, Arlete, Arnely e Michelle por fazerem parte da minha equipe de cuidado e suporte tão necessária para a conclusão dessa jornada. Também aos meus tios e tias Nizia, Jê, Arnevan, Naldo, Tércio, Valdo, Adalgisa, Deusete, Creuzete, Adriana e aos meus irmãos Brandon, Arthur e Géssica pelo apoio e torcida. Em especial ao mano Arthur por tantas conversas, aprendizados, momentos bons e ruins juntos e trocas musicais.

Gratidão aos meus “primos-irmãos” Carol, Mili, Alan, Caio Pires, Adriel, Tércio Jr, Jamilly, Andressa, Arny, Ediane, Ayesha, Anezka, Lorrana, Caio Moreira, Bebel, Isabelly, que sempre se alegraram com minhas conquistas e sentiram a separação física de forma a trazer ainda mais força e inspiração ao nosso núcleo familiar. Aos pequenos Adryan, Paulinho, Ayllan, Anyffer, Bernardo e Nicolas que trouxeram tanto amor, companheirismo e restauração de saúde aos meus dias junto aos meus amigos pets. Gratidão especial à Sechul por ter sido minha âncora. Gratidão e honra aos meus avós Isabel Vieira, João, *in memorian*, ao vovô Arlindo, *in memorian*, e à vovó Nemésia, *in memorian* e ao meu querido primo-irmão Lorhan, *in memorian*, que fizeram parte do início desse sonho e continuam fazendo parte no meu coração.

Gratidão à Dra. Karina Cesca, minha coorientadora, parceira de pesquisa, colega de laboratório, minha amiga, por ensinar-me tanto, por treinar-me e restaurar dentro de mim a paixão pela pesquisa, por fazer meus olhos brilharem novamente pelos desafios científicos e acadêmicos, por resgatar dentro de mim a fagulha propulsora da vontade de ser parte desse mundo científico novamente, de “querer fazer acontecer” tal qual ela, uma pessoa que inspira a mim e a tantos outros através do seu jeito de ser genuíno e único em sua forma empática, cordial, humana, sempre buscando aprender mais e estar aberta a ensinar com muita atenção e respeito pela história de cada um.

Aos queridos amigos de tantos anos Taís, Pri, Iuri, Lucas e Kariny por permanecerem comigo nessa jornada, em cada dia e em todos os momentos e também à Mavi e à Nadjini por tanto carinho, cuidado e resgates. Gratidão à minha família de alma Gaby, Lui, Sami, Shar, Say

que reencontrei na ilha. Por cada detalhe vivo da grandeza do que construímos, vivemos, compartilhamos, aprendemos uns com os outros, também à Lila, Doug e Felipe que fizeram parte de muitos desses resgates. Ao Vini, Mari de Los, Barbie Ghisleni, Catatau, Kupas Puppy que são extensão dessa união familiar de amor, cumplicidade e muito ensinamento. À Rafa que, além de todo o citado, é minha irmã de luta e vitória.

À Gi, Dani, Mari pelo convívio diário de tantos anos, companheirismo, amizade e cuidados. À Moni e Alê que também fizeram parte dessa fase intensa, de muita paciência e reta final para conclusão do curso. À Ju e à Dani Chernó que estiveram presente em vários momentos comigo. Carol Kinch, Félix, Carlos Calê, Laís, Luna pela amizade, carinho e cuidados pontuais que fizeram e fazem toda diferença.

Gratidão ao Levy, ao Joel e a todos da 10ª Turma da Formação “Coaching Professional” da Escola de Coaches APPA, aos meus médicos e terapeutas, Luíza Gutz, Dr. Rafael Goulart, Bruno Kiraly, Valéria Nora e Camila, Dra. Amanda, Dr. Kelton, Dra. Ana Agra, Dra. Camila, Edilso, Sara, Carlos, Renata, Alexandre, Dr. Gil, que formaram uma força-tarefa ao meu auxílio nesse processo delicado que é a saúde física, mental e espiritual.

Gratidão ao Professor Dr. Luismar Marques Porto pela trajetória que possibilitou o meu acesso a essa linha de pesquisa e a tanta aprendizagem na academia e na vida.

Gratidão aos colegas de laboratório que permaneceram, contribuíram, agregaram ao meu processo e que tenho tanto carinho e estima Willian, Emily, Carol, Gabi e Maick.

Gratidão à professora Débora de Oliveira, atual coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, por ter me inspirado desde o primeiro dia em que estive na sala de aula sob seus ensinamentos, pois mostrou-me o quão gratificante e prazeroso é aprender com quem leciona com amor pelo que faz e também, juntamente com o Edevilson (chamado carinhosamente de Edi), por estarem sempre tão solícitos e dispostos a contribuir com o meu melhor.

Gratidão à professora Maique Biavatti, ao Erlon Martin, ao Luiz Pollo e ao grupo Gepronas por sempre estarem à disposição para sanar eventuais dúvidas.

Gratidão à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) pela estrutura, oportunidade e acesso a um universo de conhecimento e à Capes pelo financiamento.

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por que?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’” (SHAW, G. B., [SI]).

RESUMO

A crescente resistência das células neoplásicas à atual geração de agentes quimioterápicos, a deficiência nas análises pré-clínicas em cultura 2D e os problemas quanto à eficácia e segurança não previstas nos testes em animais, têm sido fonte propulsora para investigação de novos agentes terapêuticos como possíveis alternativas aos tratamentos do câncer. O reposicionamento de fármacos contendo o núcleo 1,4-dihidropiridina (DHP) tem chamado a atenção por seus efeitos citotóxico, redutor de danos e estimulador do reparo de DNA em células humanas, bem como potencial antidiabético, antimicrobiano e antioxidante. Com base nesses estudos, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a citotoxicidade de compostos análogos de DHP em culturas bidimensional e tridimensional, fazendo essa correlação a partir dos ensaios de viabilidade (MTS) e morfologia celular (MCVL). Foram então utilizados quatorze análogos de DHPs sobre três linhas de células cancerígenas (A549, SKMEL-28 e GL-261) e um controle não tumoral (L929). A seleção prévia dos compostos foi feita em cultura 2D com base na redução mínima de 50% da atividade metabólica das células endoteliais e tumorais na presença dos DHPs (50 μ M). Nesta etapa foram selecionados apenas a L929, SKMEL-28 e GL-261 que, cultivadas em ambiente 2D, sofreram redução mínima de 50% na atividade metabólica sob a ação de 5 compostos, sugerindo-os como bons candidatos para a sequência do estudo. Subsequente a isso, foi determinada a concentração inibitória mínima (IC_{50}) para as células e compostos selecionados ainda em cultura 2D. Com base nos resultados, foram apresentadas as seguintes concentrações dos compostos (CP) nas respectivas células L929, SKMEL-28 e GL 261: CP2 (48,33 μ M, 100,22 μ M, 19,14 μ M); CP10 (51,6 μ M, 56,07 μ M, 24,91 μ M); CP12 (157,41 μ M, 119,57 μ M, 33,86 μ M); CP13 (83,65 μ M, 138,1 μ M, 40,46 μ M); CP14 (47,6 μ M, 61,25 μ M, 29,25 μ M). Para análise do efeito da concentração do composto em cultura 2D e 3D, foram comparados os resultados em 2D (placa) com dois tipos de matrizes derivadas de nanocelulose bacteriana, CellFate[®] pura e tratada com colágeno, doadas pela empresa Biocelltis Biotecnologia S.A. Dentre as células estudadas a GL-261 apresentou a maior sensibilidade aos compostos em cultura 2D, enquanto em 3D não houve citotoxicidade para a mesma concentração usada. Dentre os compostos selecionados, o composto 2 apresentou um comportamento particular com citotoxicidade semelhante para célula SKMEL-28 nas três condições de cultivo. A maioria dos compostos tiveram sua atividade citotóxica reduzida sob o cultivo nas plataformas tridimensionais em comparação com o cultivo em placas, possibilitando uma representatividade maior das células neoplásicas e melhor compreensão da sua resistência aos agentes quimioterápicos quanto às análises pré-clínicas ineficientes em cultura 2D. Assim este estudo auxilia na exploração de potenciais microambientes de cultivo celular voltados para triagem de fármacos, contribuindo às pesquisas de desenvolvimento de modelos tumorais para avaliação pré-clínica *in vitro*, visando a eficácia dos medicamentos a serem desenvolvidos contra o câncer. Enfatiza a necessidade de estratégias sobre o direcionamento das potencialidades dos mais diversos análogos de DHP voltados às interações entre as células tumorais e os fatores microambientais promotores de tumores partindo de simulações mais fiéis do mecanismo celular nativo.

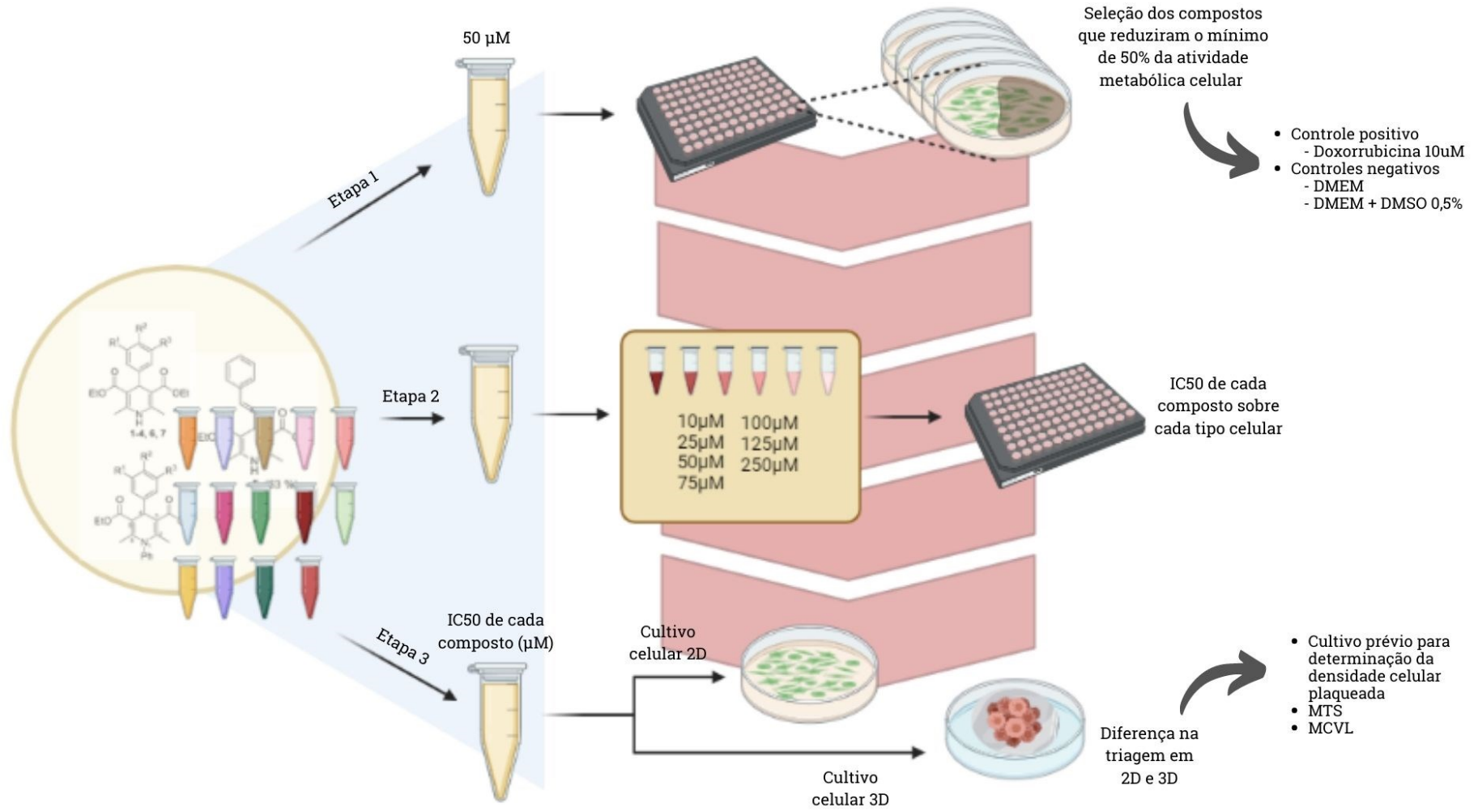
Palavras-chave: nanocelulose bacteriana, colágeno, cultivo celular 3D, CellFate[®], 1,4-dihidropiridina, DHP, triagem.

ABSTRACT

The growing resistance of neoplastic cells to the current generation of chemotherapeutic agents, the deficiency in preclinical analyzes in 2D culture and the problems regarding the unforeseen efficacy and safety of animal tests, have been a driving source for the investigation of new therapeutic agents as possible alternatives to cancer treatments. The repositioning of drugs containing the 1,4-dihydropyridine (DHP) nucleus has drawn attention for its cytotoxic, damage-reducing and DNA repair stimulator effects in human cells, as well as antidiabetic, antimicrobial and antioxidant potential. Based on these studies, this research aimed to evaluate the cytotoxicity of DHP analog compounds in 2D and 3D culture models, making this correlation from the viability assays (MTS) and cell morphology (MCVL) in order to study the cytotoxic influence of these compounds. Therefore, fourteen DHP analogues were used on three cancer cell lines (A549, SKMEL-28 and GL-261) and a non-tumor control (L929). Previous selection of evaluated compounds was performed in 2D based on a minimum reduction of 50% of the metabolic activity of endothelial and tumor cells in the presence of DHPs (50 μ M). At this stage, only L929, SKMEL-28 and GL-261 were selected, which, cultivated in a 2D environment, underwent a minimum reduction of 50% in metabolic activity under the action of 5 compounds, suggesting them as good candidates for the study sequence. Subsequently, the minimum inhibitory concentration (IC₅₀) for selected cells and compounds still in 2D was determined. Based on the results, the following concentrations of compounds (CP) in the respective L929, SKMEL-28 and GL 261 cells were presented: CP2 (48.33 μ M, 100.22 μ M, 19.14 μ M); CP10 (51.6 μ M, 56.07 μ M, 24.91 μ M); CP12 (157.41 μ M, 119.57 μ M, 33.86 μ M); CP13 (83.65 μ M, 138.1 μ M, 40.46 μ M); CP14 (47.6 μ M, 61.25 μ M, 29.25 μ M). To analyze the effect of the compounds concentration in 2D and 3D cultures, the results in 2D (plate) were compared with two types of matrices derived from bacterial nanocellulose, pure CellFate® and CellFate® treated with collagen, donated by the company Biocelltis Biotecnologia S.A. Among the cells studied, GL-261 showed the highest sensitivity to compounds in 2D culture, while in 3D there was no cytotoxicity for the same concentration used. Among the selected compounds, the compound 2 showed a particular behavior with similar cytotoxicity to SKMEL-28 in the three culture conditions. Most compounds had their cytotoxic activity reduced under cultivation on three-dimensional platforms compared to cultivation on plates, allowing a greater representation of neoplastic cells and a better understanding of their resistance to chemotherapeutic agents regarding inefficient preclinical analysis in 2D culture. Thus, this study helps in the exploration of potential cell culture microenvironments aimed at drug screening, contributing to research into the development of tumor models for pre-clinical *in vitro* evaluation, aiming at the effectiveness of drugs to be developed against cancer. It emphasizes the need for strategies to target the potential of the most diverse DHP analogues aimed at interactions between tumor cells and microenvironmental factors that promote tumors, starting from more faithful simulations of the native cell mechanism.

Keywords: nanocellulose, bacterial, collagen, culture, cell, 3D, CellFate®, 1,4-dihydropyridine, DHP, screening.

RESUMO GRÁFICO



LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Números estimados de casos incidentes e de mortes de câncer em todo o mundo, em ambos os sexos e em todas as idades..... | 23 |
| Figura 2 - Número de novos casos estimados de 2020 a 2040 para todos os tipos de câncer, em ambos os sexos e para todas as idades [0-85+] | 24 |
| Figura 3-Infográfico das etapas de pesquisa, desenvolvimento e estudo clínico na elaboração de um medicamento..... | 26 |
| Figura 4 - O processo de P&D na indústria farmacêutica | 27 |
| Figura 5 - Estrutura química da celulose..... | 36 |
| Figura 6 - Os componentes básicos que compõem a engenharia de tecidos. | 40 |
| Figura 7 -Micrografias MEV do liofilizado da membrana nos lados (a) superior e (b) inferior com ampliação de 5000 ×; e (c) visualização no plano sagital com ampliação de 10000 ×.... | 41 |
| Figura 8- Esquema geral da reação de Hantzsch..... | 42 |
| Figura 9- Subunidades de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem..... | 44 |
| Figura 10 - Esquema placa/ agarose/ membrana | 47 |
| Figura 11 - Via de síntese dos compostos 1 ao 14. | 48 |
| Figura 12-Reativação das células | 49 |
| Figura 13 - Fluxograma das etapas dos ensaios realizados | 50 |
| Figura 14 - Desenho ilustrativo da semeadura das células sobre as membranas. | 52 |
| Figura 15–Adição dos compostos sobre os cultivos celulares em 2D e 3D..... | 53 |
| Figura 16- Esquema simplificado do teste de viabilidade celular – MTS..... | 54 |
| Figura 17 - Atividade metabólica das linhagens L929, A549, SKMEL-28 e GL261 após tratamento com os 14 compostos após 24 horas na concentração de 50 μ M. | 56 |
| Figura 18 - Resumo dos compostos e suas variações da atividade citotóxica conforme estrutura. | 59 |
| Figura 19- Atividade metabólica da linhagem de L929, A549, SKMEL-28 e GL261 para os compostos 2, 10, 12, 13 e 14, na concentração de 50 μ M, selecionadas na triagem..... | 60 |
| Figura 20- Atividade metabólica de células L929, SKMEL-28 e GL261 após 24 horas de tratamento DHPs (CP2, CP10, CP12, CP13, CP14) com diferentes concentrações. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se 3 replicatas para cada ensaio..... | 61 |
| Figura 21 - Triagem dos compostos em cultivo 3D nas matrizes CellFate® pura e tratada com colágeno nas concentrações do IC50 encontrados em cultivo 2D..... | 63 |

Figura 22- Análise morfológica de autofluorescência por MCVL em culturas de SKMEL-28
1.a) 2D controle, 1.b) 2D com atividade do CP14 na concentração do IC50; 2.a) CellFate® pura
- controle, 2.b) CellFate® pura - com atividade do CP14 na concentração do IC50; e 3.a)
CellFate® com colágeno - controle, 3.b) CellFate® com colágeno - com atividade do CP14 na
concentração do IC50. 65

LISTA DE QUADROS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1- Etapas e atores da cadeia de produção farmacêutica..... | 25 |
| Quadro 2- Culturas de células 2D e 3D: características importantes | 29 |
| Quadro 3 - Comparação entre suportes à base de hidrogel de material duro polimérico, fibras de vidro hidrofílicas, levitação magnética e esferoides com revestimentos de fixação ultrabaixa. | 31 |
| Quadro 4- Estudos usando os métodos <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> para modificação da BNC. | 38 |
| Quadro 5 - Aplicações biomédicas utilizando BNC..... | 39 |
| Quadro 6- Características das quatro repetições homólogas do tipo L da subunidade α_1 | 45 |
| Quadro 7- Descrição dos compostos análogos do DHP utilizados nesse trabalho..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

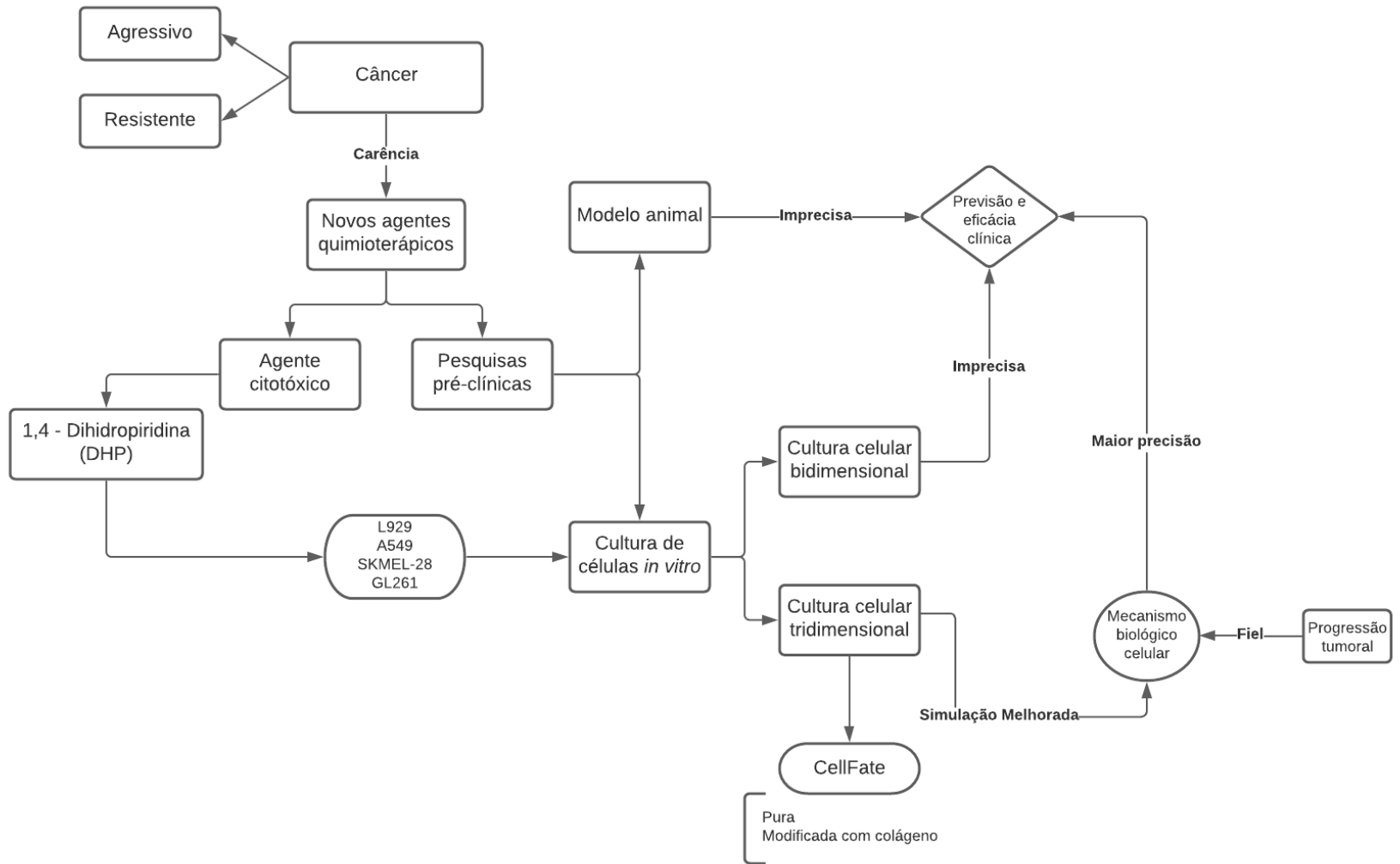
| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Concentração em μM de IC50 para cada composto sobre as células..... | 62 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1. | OBJETIVOS | 21 |
| 1.1.1. | Objetivo geral | 21 |
| 1.1.2. | Objetivos Específicos | 21 |
| 2. | REVISÃO DA LITERATURA | 22 |
| 2.1. | A PROBLEMÁTICA DO CÂNCER..... | 22 |
| 2.2. | A DECADÊNCIA DOS TESTES EM ANIMAIS E O AMBIENTE TUMORAL 2D vs 3D NA TRIAGEM <i>IN VITRO</i> DE NOVOS FÁRMACOS | 25 |
| 2.3. | CULTURA DE CÉLULAS 3D PARA TRIAGEM DE FÁRMACOS | 33 |
| 2.4. | HIDROGÉIS | 34 |
| 2.4.1. | Modelo 3D de Nanocelulose Bacteriana – BNC | 35 |
| 2.4.2. | Aplicação da nano celulose bacteriana - BNC | 37 |
| 2.4.3. | Uso da BNC para triagem de fármacos | 39 |
| 2.5. | A 1,4-DIHIPIRIDINA (DHP) NA BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL | 41 |
| 2.5.1. | O que são compostos DHP? | 41 |
| 2.5.2. | Por que usar um bloqueador de transporte de Ca²⁺ | 43 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS | 46 |
| 3.1. | MATERIAIS | 46 |
| 3.2. | MÉTODOS | 46 |
| 3.2.1. | Montagem das placas com agarose para as matrizes CellFate® | 46 |
| 3.2.2. | Síntese e solubilização dos compostos | 47 |
| 3.2.3. | Tratamento das células com os compostos | 49 |
| 3.2.3.1. | Etapa 1 – Triagem dos Compostos..... | 50 |
| 3.2.3.2. | Etapa 2- Identificação da concentração inibitória absoluta (IC50) | 51 |
| 3.2.3.3. | Etapa 3- Comparação da triagem em cultivo 2D vs 3D | 51 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4. Caracterização | 53 |
| 3.2.4.1. Viabilidade celular por MTS..... | 53 |
| 3.2.4.2. Autofluorescência por MCVL..... | 54 |
| 3.2.5. Análise de dados | 55 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 4.1. Etapa 1- Triagem dos Compostos | 56 |
| 4.2. Etapa 2- Identificação da concentração inibitória absoluta (Ic50)..... | 60 |
| 4.3. Etapa 3- Comparação da triagem em cultivo 2D vs 3D..... | 62 |
| 5. CONCLUSÃO | 69 |
| REFERÊNCIAS | 71 |

DIAGRAMA CONCEITUAL



1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por uma em cada seis mortes. Existem mais de cem diferentes tipos de doenças malignas denominadas como câncer que são caracterizadas por possuírem crescimento desordenado de células, podendo invadir tecidos adjacentes ou órgãos. Essas células possuem tendências muito agressivas e sem controle, que acabam formando tumores que podem se espalhar por outras regiões do corpo (INCA, 2020).

Tem-se, portanto, um grave problema da saúde pública mundial, em parte devido o desafio com a crescente resistência das células neoplásicas à atual geração de agentes quimioterápicos (PETER, A. et al, 2021). Novos agentes terapêuticos têm sido então investigados como possíveis alternativas. Estudos relatam a 1,4-dihidropiridina (DHP) como um agente citotóxico, redutor de danos e estimulador do reparo de DNA em células humanas, bem como potencial antidiabético, antimicrobiano e antioxidante (MIRI, R. et al, 2011; RYABOKON, N.I. et al, 2015; OLEJNÍKOVÁ, P. et al, 2014; COMINACINI, L. et al, 2003; BRIEDE, J. et al, 2008).

Muitos pesquisadores têm focado no crescimento, apoptose e resistência das células cancerígenas às drogas através dos modelos de cultura de células *in vitro* ou modelos animais com a finalidade de analisar com mais clareza a eficácia clínica dos tratamentos anticâncer. Entretanto, o estudo da eficácia terapêutica em pesquisas pré-clínicas usando linhagens de células cancerígenas ainda possui grande desvantagens, pois nem sempre a previsão e a eficácia clínica é precisa, como no caso do cultivo em placas, enquanto que nos modelos animais, além de possuírem maiores exigências éticas, financeiras e de tempo (KAMANGAR et al apud WANG, J. et al, 2018), são modelos com limitações significativas, nos quais pode haver diferenças em como os animais e humanos absorvem, distribuem, metabolizam ou eliminam uma determinada substância ou material. Ou seja, algo que não é tóxico para animais em uma baixa exposição pode ser tóxico para humanos e vice-versa (RESNIK, D.B.; TINKLE, S.S., 2007).

Para que os mecanismos biológicos que influenciam a progressão tumoral e a resistência às terapias sejam consideradas de forma mais precisa nas investigações pré-clínicas, modelos aprimorados têm sido desenvolvidos para obter um refinamento dos resultados clínicos, bem como auxiliar no direcionamento das terapias (SIMPSON, C. L. et al, 2011). Devido à proximidade das características ao microambiente tumoral, modelos tridimensionais de co-

cultura foram reconhecidos como mais confiáveis para simular a estrutura, os mecanismos moleculares e celulares dos tecidos tumorais, motivando estudos cada vez mais promissores e mostrando novas possibilidades científicas (BEAUMONT et al. 2013 ; WEISWALD et al. 2015 ; KATT et al. 2016 ; SINGH et al. 2016). Uma vez que trazem mais clareza à compreensão do mecanismo de interação célula-célula e célula-matriz e reproduzem com maior fidelidade a arquitetura e a heterogeneidade celular dos tumores, os ambientes 3D tornaram-se mais adequados para triagem *in vitro* de novos agentes terapêuticos do que culturas 2D (MIKI et al. 2012; SHANG et al. 2019; ASTASHKINA et al. 2012; ZANONI et al. 2019).

O interesse dos pesquisadores está sendo cada vez mais estimulado conforme esses novos parâmetros de cultivo celular vêm se desenvolvendo, devido à busca por materiais e técnicas que fomentem a crescente inovação em cultura 3D. A celulose bacteriana é um dos polímeros naturais que tem se mostrado como um biomaterial muito relevante para tais estudos, por possuir notáveis propriedades mecânicas, tanto no estado seco quanto no úmido, físicas e biológicas (WANG, J., 2018) podendo confirmar o benefício de sua utilização pela presença de características como estabilidade estrutural e boa resistência à ruptura, alta porosidade e capacidade de retenção de água, bem como alta moldabilidade; além de propriedades biológicas como alta capacidade de proliferação de células humanas e ser biocompatível com os tecidos humanos. Há também uma grande vantagem por ser considerada mais econômica devido sua alta durabilidade (SCHMITZ et al., 2014 apud SULAEVA et al., 2015), tendo, portando, mostrado proliferação, diferenciação e adesão celular adequados para matriz 3D nos estudos de engenharia de tecidos (REIS, E. M. et al, 2017, BRACKMANN, C. et al, 2010; FINK, H. et al, 2010; ZABOROWSKA, M. et al, 2010; SALEH, N.A. et al, 2021).

Apesar de existirem muitos trabalhos nesta perspectiva ainda existem muitas questões científicas que ainda carecem de respostas. Portanto este estudo vem para auxiliar na exploração de plataformas tridimensionais com o foco no potencial das matrizes de hidrogel feitos a partir de nanocelulose bacteriana para o cultivo tumoral. Seu maior diferencial é o direcionamento desses cultivos à triagem 3D de análogos de 1,4-dihidropiridina (DHP) quanto às interações entre as células tumorais e os fatores microambientais mais realistas ao ambiente celular nativo que influenciam no comportamento dos canais iônicos celulares, o que contribui para a pesquisa do desenvolvimento de modelos tumorais para avaliação pré-clínica *in vitro* quanto a eficácia dos medicamentos a serem desenvolvidos contra o câncer.

Nesse contexto, a influência de diferentes compostos sobre as células tumorais foi estudada. Uma seleção prévia em 2D de 14 compostos análogos de DHP foram avaliados com o intuito de verificar a concentração inibitória absoluta (medida quantitativa de uma

determinada substância que é necessária para inibir um processo biológico pela metade, tendo como referência o controle), ou seja, o valor de IC50 das células endoteliais. Na sequência foi avaliado o comportamento das células cultivadas e tratadas com os compostos em placa, comparadas com as cultivadas e tratadas sobre dois tipos de matrizes CellFate®, na qual um tipo possuía colágeno e o outro não possuía, para assim selecionar os análogos citotóxicos para as células tumorais e avaliar a influência do colágeno no mecanismo biológico celular.

1.1.OBJETIVOS

1.1.1.Objetivo geral

Avaliar os compostos análogos de DHP com atividade antitumoral em modelo de cultura celular 2D para compará-las com as plataformas tridimensionais CellFate® tratadas e não tratadas com colágeno.

1.1.2.Objetivos Específicos

- Selecionar compostos com capacidade de reduzir a atividade metabólica das células em cultura 2D;
Analisar os efeitos dos compostos selecionados em cultura 3D quando comparada com 2D.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1.A PROBLEMÁTICA DO CÂNCER

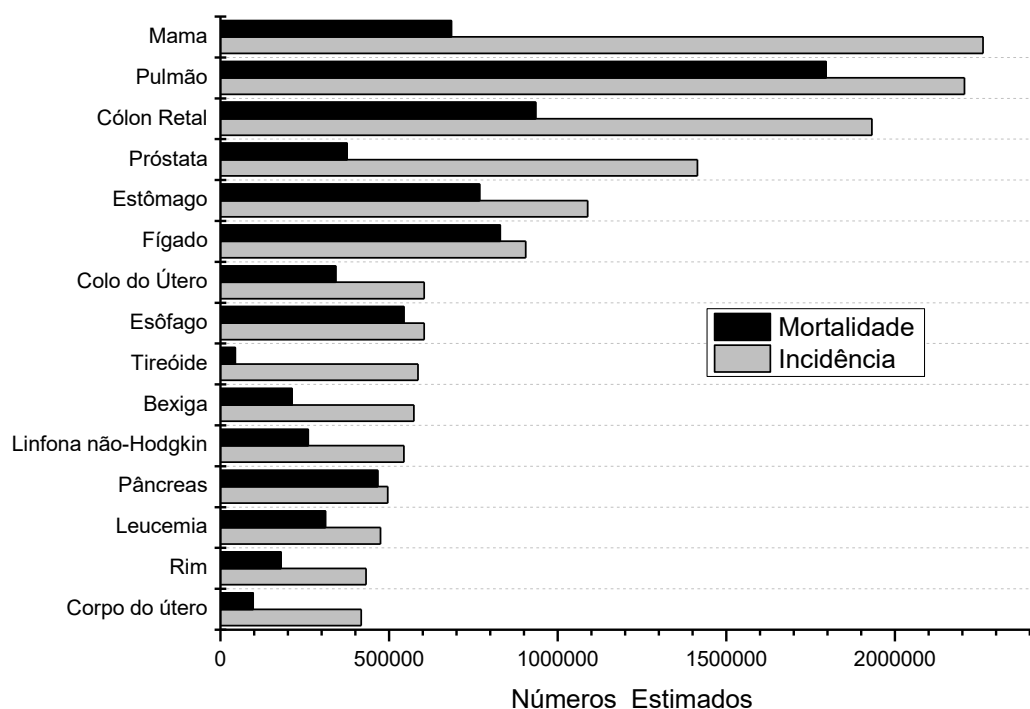
Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por uma em cada seis mortes. Estima-se que em 2020, de acordo com o Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) da Agência Internacional da Pesquisa do Câncer (IARC), o número de mortes mundiais causadas pela doença foi de aproximadamente 10.000.000 (dez milhões) de pessoas, sendo o número de casos incidentes, em ambos os sexos, praticamente o dobro (GLOBOCAN, 2020).

Existem mais de cem diferentes tipos de doenças malignas denominadas como câncer, ou neoplasia, que é um termo geral referente a esse extenso grupo de doenças caracterizadas por possuírem crescimento anormal e desordenado de células além de seus limites usuais, podendo surgir e afetar quase todos os tipos de tecido do corpo, invadindo tecidos adjacentes ou órgãos. Essas células possuem tendências muito agressivas e sem controle, que acabam formando tumores que podem se espalhar por outras regiões do corpo humano gerando metástase (INCA, 2020; HERREROS-POMARES, A. et al, 2021).

Os diferentes tipos de neoplasias correspondem aos diversos tipos celulares do corpo (INCA, 2020). O Instituto OncoGuia explica que quando esse crescimento descontrolado de células anormais no corpo inicia no osso, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos ou outro tecido conjuntivo ou de suporte, ele é denominado de sarcoma. Já os carcinomas incluem alguns subtipos, como o adenocarcinoma, carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células de transição, e iniciam na pele ou em tecidos que revestem ou cobrem os órgãos internos. As leucemias começam no tecido que produz o sangue, fazendo com que um grande número de células anormais entre na circulação sanguínea. Linfomas e mielomas, em células do sistema imunológico e cânceres do Sistema Nervoso Central começam nos tecidos do cérebro e da medula espinhal (ONCOGUIA, 2017).

Então, como visto, o câncer pode surgir em qualquer parte do corpo, mas alguns órgãos são mais afetados do que outros, dependendo, também, da agressividade do tumor (SCHROEDER et al., 2011). Entre os mundialmente mais afetados estão o de mama, próstata, pulmão, colo do útero, o cólon e reto (intestino grosso), o estômago, fígado, corpo do útero, ovário e tireoide (IARC, 2020), conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Números estimados de casos incidentes e de mortes de câncer em todo o mundo, em ambos os sexos e em todas as idades



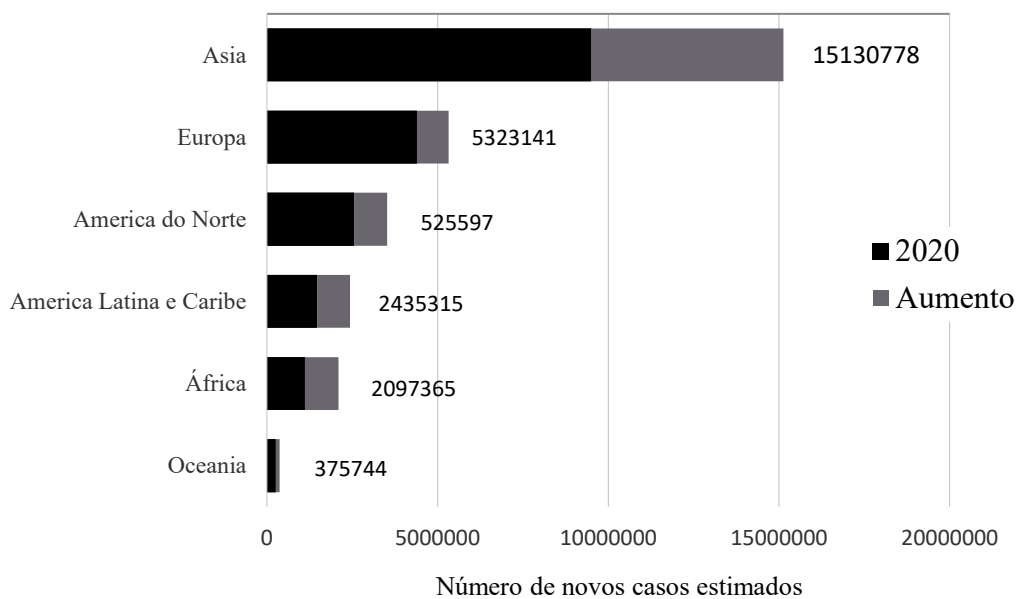
Fonte: Adaptado de Observatório Global do Câncer da Agência Internacional da Pesquisa do Câncer, 2021

O câncer de pulmão é apontado como a principal causa de morte por essa neoplasia em todo o mundo (FENG, H. et al, 2019; ZHANG, G., 2017). Já o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres (WANG, J. et al, 2017). Segundo o Instituto Nacional de Câncer, o câncer de pele é o mais frequente no Brasil, correspondendo cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país. Enquanto os tumores do Sistema Nervoso Central representam de 1,4 a 1,8% dos tumores malignos no mundo, sendo cerca de 88% dos tumores localizados no cérebro. Tem-se, portanto, um grave problema da saúde pública mundial, em parte devido o desafio com a crescente resistência das células neoplásicas à atual geração de agentes quimioterápicos (PETER, A. et al, 2021).

O desenvolvimento do tumor demanda um processo de múltiplos passos, envolvendo, inicialmente, a promoção de etapas nas quais uma série de lesões são acumuladas no DNA a tal ponto que a célula perde seu controle de proliferação, diferenciação, apoptose e reparo (RYE, C. et al, 2016). Inúmeros tipos de células neoplásicas possuem alta velocidade de multiplicação. Assim, podem formar tumores com grandes proporções que, alcançando 180 μm de diâmetro,

recrutam novos vasos sanguíneos (angiogênese) para suprir a necessidade de oxigenação tecidual de todas as suas células (RYE, C. et al, 2016). A Figura2 mostra o número de novos casos estimados de 2020 a 2040, de acordo com a IARC, revelando a urgência de medidas inovadoras de combate ao câncer na corrida contra o tempo.

Figura 2 - Número de novos casos estimados de 2020 a 2040 para todos os tipos de câncer, em ambos os sexos e para todas as idades [0-85+]



Fonte: Adaptado de Observatório Global do Câncer da Agência Internacional da Pesquisa do Câncer, 2021

As causas do câncer podem ser as mais diversas, ocasionadas tanto por agentes internos ao organismo, como as causas geneticamente pré-determinadas, quanto por agentes externos a ele, ao que se refere ao meio ambiente, hábitos ou costumes próprios de uma sociedade, ou até mesmo inter-relacionados (EVAN, G.I; VOUSDEN, K.H, 2001). Por ser uma doença altamente complexa, o tumor pode associar-se a vários processos, como a sinalização proliferativa sustentada, o potencial replicativo ilimitado, a ativação de invasão e metástase. Portanto, o desenvolvimento de drogas antitumorais ou agentes terapêuticos direcionados a qualquer um desses processos é importante (TÜRKAN, K. et al, 2021).

2.2.A DECADÊNCIA DOS TESTES EM ANIMAIS E O AMBIENTE TUMORAL 2D VS 3D NA TRIAGEM *IN VITRO* DE NOVOS FÁRMACOS

Em 2004, foi estimado pela *Food and Drug Administration* (FDA) que 92% dos medicamentos aprovados em testes animais são barrados antes de chegarem ao mercado devido aos problemas quanto à eficácia e segurança não previstas nos testes em animais (HARDING, A., 2004). De acordo com Pippin (2013), com base nos dados específicos relatados em cada fase, a taxa de falha aumentou para 96%, sendo a oncológica a área terapêutica com a maior taxa de falhas segundo Arrowsmith e Miller (2013) em seu relatório sobre as falhas nas fases II e III de 2011–2012 dos candidatos a medicamentos.

Segundo o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) as etapas e os atores da cadeia de produção farmacêutica se dão como exposto no Quadro 1. Os primeiros passos para a criação de um novo medicamento ocorrem na etapa de pesquisa, na qual o trabalho consiste inicialmente na identificação e validação do alvo para um possível medicamento, descobrir uma molécula promissora (*lead*) candidata a se tornar uma nova droga (CGEE,2017).

Quadro 1- Etapas e atores da cadeia de produção farmacêutica

| Etapas da cadeia | Atores principais |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. P&D [Pesquisa e Desenvolvimento] | Grandes empresas farmacêuticas (GEFs), <i>startups</i> , <i>Contract Research Organizations</i> (CROs), universidades, instituto de pesquisa. |
| 2. Fabricação | |
| 2.1.IFAS [Ingredientes farmacêuticos ativos] | GEFs, farmoquímicas, <i>Contract Manufacturing Organizations</i> (CMOs) |
| 2.2. Medicamentos | GEFs, fabricantes de genéricos, CMOs |
| 3. Marketing | GEFs, <i>Contract Sales Organizations</i> (CSOs) |

Fonte: Adaptada do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2017.

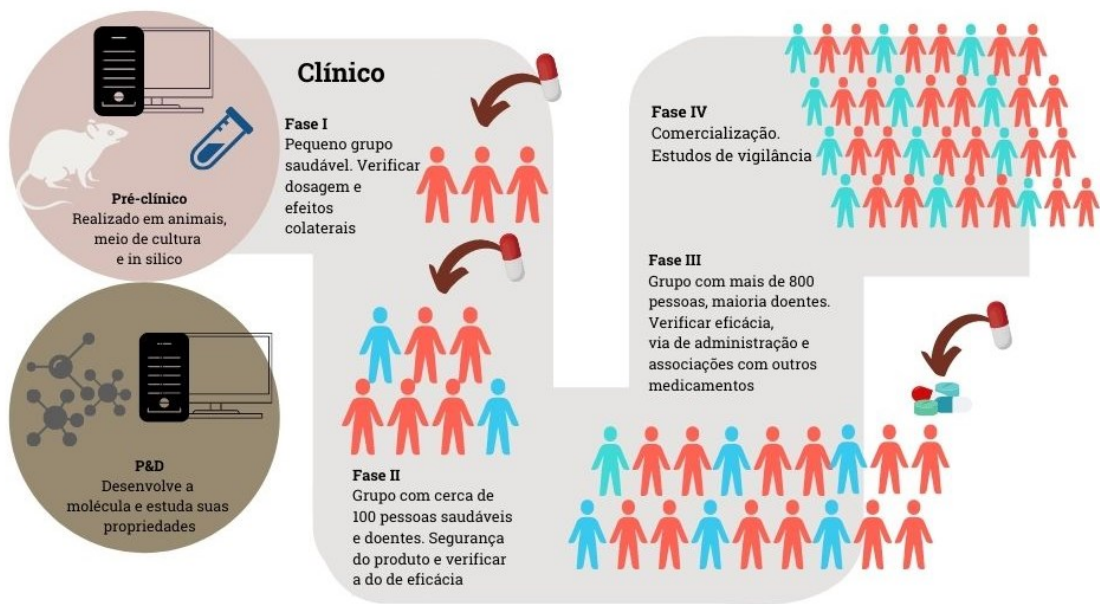
Segundo o PhRMA (2015), a droga em potencial deve seguir então para os ensaios iniciais e otimização química visando efetividade e segurança. Esses testes são denominados pré-clínicos laboratoriais (*in vitro*) e em animais (*in vivo*) usados para determinar a segurança do composto para seguir os testes em humanos, que são os testes clínicos dispostos de fases que estão elencadas a seguir:

- Fase I: teste inicial de segurança em um número pequeno de voluntários saudáveis.
- Fase II: teste de segurança e eficácia em um número pequeno de pacientes.

– Fase III: demonstração de segurança e eficácia em um grande número de pacientes.

O dossiê de pesquisa é então apresentado aos órgãos regulatórios e aos comitês de ética em pesquisa, que aprovam se o novo medicamento pode ser testado em pessoas. Caso aprovado, segue-se então para os testes clínicos, fase IV (pós-lançamento), na qual ocorre a avaliação da segurança de longo prazo ou efeitos em grupos específicos de pacientes (PhRMA, 2015). A Figura 3 expõe esse percurso de ensaios e testes de forma sintetizada e organizada.

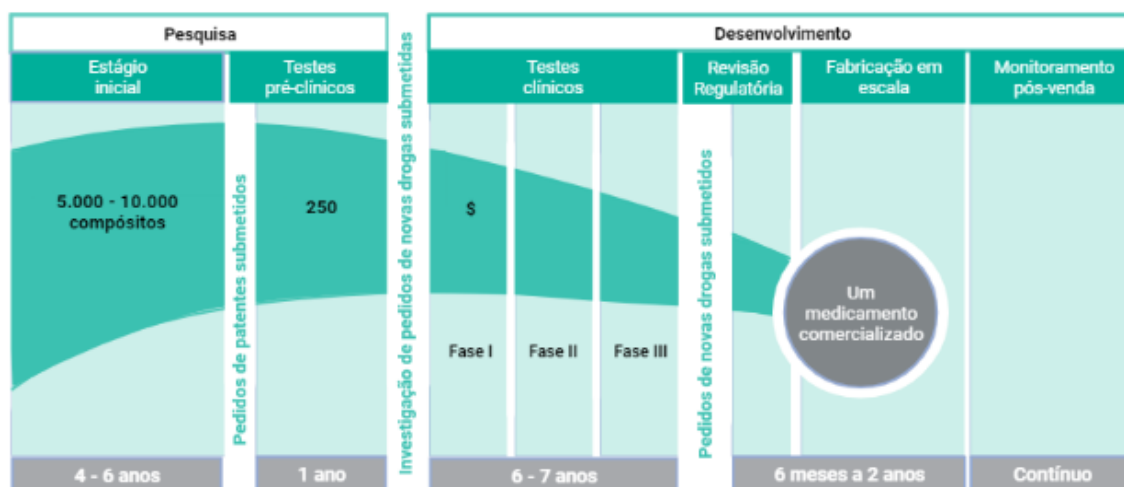
Figura 3-Infográfico das etapas de pesquisa, desenvolvimento e estudo clínico na elaboração de um medicamento.



Fonte: Adaptado de Santos (2015).

A Figura 4 apresenta dados aproximados dos tempos gastos em cada estágio da etapa de pesquisa e desenvolvimento, correlacionando ao número de compostos de que se parte para chegar com sucesso a um medicamento.

Figura 4 - O processo de P&D na indústria farmacêutica



Fonte: Adaptado do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (2017) apud IFPMA (2015) feito com BioRender.com.

Os estudos pré-clínicos desempenham um papel fundamental na minimização dos riscos dos medicamentos à integridade humana. Contudo, esses estudos feitos em animais têm limitações significativas, podendo haver diferenças em como os animais e humanos absorvem, distribuem, metabolizam ou eliminam uma determinada substância ou material. Ou seja, algo que não é tóxico para animais em uma baixa exposição pode ser tóxico para humanos e vice-versa (RESNIK, D.B.; TINKLE, S.S., 2007).

Tanto na medicina quanto na farmacologia, os medicamentos e suas descobertas possuem o aspecto mais importante. Entretanto, as baixas taxas de sucesso dos testes de novos medicamentos em ensaios pré-clínicos e modelos animais são desproporcionais ao grande investimento financeiro, bem como demanda uma grande quantidade de tempo (LANGHANS, 2018).

Sobretudo, a conscientização sobre o bem-estar animal tem aumentado consideravelmente, o que acelera a geração de modelos humanos *in vitro* que sejam mais preditivos nas respostas humanas para que, eventualmente, venha substituir os modelos animais em uma perspectiva de precisão e ética (CHEN, X. et al, 2020).

As culturas de células 2D são usadas para a maioria das pesquisas *in vitro* desde o início do século passado. São os modelos mais comumente usados para testes. Essas culturas geralmente possuem natureza econômica e conveniente para observação e medição das células. Foram difundidas e bem aceitas pela maioria dos pesquisadores e cientistas (IMAMURA, Y., 2015). Inúmeros processos biológicos, bem como algumas doenças, foram descobertos com o

auxílio desse tipo de modelo de cultivo. No entanto, são incapazes de mimetizar o microambiente que as células *in vivo* necessitam para seu desenvolvimento (COSTA et al., 2016; LV et al., 2017).

As células em cultivo bidimensional (2D) dependem da aderência de uma superfície plana, como vidro ou poliestireno, que fornece o suporte mecânico necessário para que elas fiquem dispostas em monocamadas bidimensionais, podendo ser um tipo único de células ou múltiplas, primárias (isoladas recentemente do tecido) ou linhas de células (já imortalizadas) (DUVAL, K. et al, 2017; IMAMURA, Y., 2015). Entretanto, a superfície plana das culturas 2D não repassam de maneira precisa a forma que as células crescem e mantêm suas funções, como são afetadas por doenças e lesões ou como respondem a isso. Sua capacidade de reproduzir os níveis de respostas *in vivo* é significativamente limitada (FANG, Y. et al, 2017); não preveem a toxicidade e outros efeitos biológicos com precisão, devido a ausência de processos biológicos de crescimento, diferenciação e transporte que ocorrem nas camadas celulares quando entram em contato com tecidos, dependendo assim de um microambiente fisiológico semelhante a uma matriz extracelular (CHEN, X. et al, 2020).

O Quadro 2 mostra algumas características importantes em que os modelos 2D e 3D se diferenciam.

Quadro 2- Culturas de células 2D e 3D: características importantes

| Características importantes | Culturas de células 2D | Culturas de células 3D | Referências |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Forma celular | <ul style="list-style-type: none"> A forma das células é plana e alongada, uma vez que as células só podem crescer e se expandir em duas dimensões; As células crescem em uma monocamada na placa. | <ul style="list-style-type: none"> A forma natural da célula é preservada e crescem em agregados/esferoides; Os esferoides contêm várias camadas. | COSTA et al., 2016; LANGHANS, 2018. |
| Exposição celular ao meio | <ul style="list-style-type: none"> Todas as células na cultura recebem a mesma quantidade de nutrientes e fatores de crescimento do meio na placa; Isso faz com que mais células estejam no mesmo estágio do ciclo celular. | <ul style="list-style-type: none"> Os nutrientes não precisam ser divididos igualmente entre todas as células, mas podem ser, se necessário; As células centrais muitas vezes permanecem inativas, pois elas recebem menos oxigênio e fatores de crescimento do meio. Este processo se assemelha às células centrais de células tumorais, tornando possível imitar o comportamento e estrutura de uma célula tumoral <i>in vivo</i>. | DHALIWAL, 2012; COSTA et al., 2016; LANGHANS, 2018. |
| União celular | <ul style="list-style-type: none"> As uniões celulares são menos comuns e não representam precisamente as junções reais. | <ul style="list-style-type: none"> As junções celulares são comuns e permitem comunicação célula a célula; As células se comunicam por meio de troca de íons, pequenas moléculas e correntes elétricas. | PONTES SOARES et al., 2012; RAVI et al., 2015; COSTA et al., 2016; LANGHANS, 2018; LANG et al., 2019. |
| Diferenciação celular | <ul style="list-style-type: none"> A diferenciação celular é pobre | <ul style="list-style-type: none"> As células são bem diferenciadas | IMAMURA et al., 2015; COSTA et al., 2016; LANGHANS, 2018. |
| Sensibilidade as drogas | <ul style="list-style-type: none"> As células costumam ter pouca resistência aos medicamentos fazendo parecer que as drogas administradas às células foram um sucesso no tratamento As drogas não são bem metabolizadas | <ul style="list-style-type: none"> As células costumam ter mais resistência ao tratamento de drogas. O metabolismo da droga é muito melhor Dá uma representação mais precisa dos efeitos da droga | HAISER et al., 2015; IMAMURA et al., 2015; LANGHANS, 2018. |
| Proliferação celular | <ul style="list-style-type: none"> As células proliferam em um ritmo anormalmente rápido. | <ul style="list-style-type: none"> As taxas de proliferação são realistas e podem ser altas ou baixas, dependendo da técnica e dos tipos de células em estudo | RAVI et al., 2015; LANGHANS, 2018. |
| Níveis de expressão | <ul style="list-style-type: none"> Os níveis de expressão de genes e proteínas são frequentemente muito diferentes em comparação com modelos <i>in vivo</i>. | <ul style="list-style-type: none"> Os níveis de expressão de genes e proteínas se assemelham aos níveis encontrados nas células <i>in vivo</i>. | RAVI et al., 2015; COSTA et al., 2016; LANGHANS, 2018. |
| Custo | <ul style="list-style-type: none"> Para estudos em grande escala, é muito mais barato do que usar cultura 3D. | <ul style="list-style-type: none"> São normalmente mais caros do que as técnicas de cultura de células 2D e requerem mais tempo; A cultura de células 3D reduz as diferenças entre a triagem de drogas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diminuindo a probabilidade de precisar usar modelos animais. | RAVI et al., 2015; COSTA et al., 2016; LANGHANS, 2018. |
| Apoptose | <ul style="list-style-type: none"> Os medicamentos podem induzir facilmente à apoptose nas células. | <ul style="list-style-type: none"> Taxas mais altas de resistência para apoptose induzida por drogas. | COSTA et al., 2016. |
| Resposta ao estímulo | <ul style="list-style-type: none"> Representação imprecisa da resposta aos estímulos mecânicos das células; As células não podem experimentar a gravidade, uma vez que são incapazes de se expandir para a terceira dimensão. | <ul style="list-style-type: none"> Representação precisa da resposta aos estímulos mecânicos das células; As células podem experimentar a gravidade, dando uma representação mais precisa de uma célula <i>in vivo</i>. | RAVI et al., 2015; COSTA et al., 2016. |
| Uso e análise | <ul style="list-style-type: none"> Altamente replicável e facilmente interpretável; Melhor para culturas de longo prazo | <ul style="list-style-type: none"> Pode ser difícil replicar experimentos; Pode ser difícil interpretar os dados | KAPALCZYNSKA et al., 2018. |

Fonte: Adaptada de Jensen Caleb e Teng Yong (2020).

No meio científico tem havido muita dedicação em estudos de modelos de culturas de células que visam aprimorar ambientes biomiméticos que sejam fisiologicamente mais relevantes e preditivos do que a cultura 2D, melhorando assim a simulação da interação célula-célula ou célula-MEC (membrana extracelular) *in vivo* (DUVAL, K. et al, 2017; KOLENDA, T. et al, 2016). Os resultados demonstram que a cultura de células 3D impacta significativamente no monitoramento do número de células, diferenciação, sobrevivência, proliferação, morfologia, respostas celulares, bem como ao metabolismo de drogas e síntese de proteínas (BONNIER, F. et al, 2015; BAKER, B.M., 2012; ANTONI et al, 2015), isso tudo devido à capacidade que a cultura de células 3D têm de modelar células *in vivo*, durante seu cultivo *in vitro* (RAVI et al, 2015).

Portanto, inúmeras técnicas têm sido apresentadas como suportes baseados em diferentes tipos de materiais como o hidrogel, polímeros duros, fibra de vidro hidrofílica e organoides, como no encapsulamento de células em hidrogéis (SONG, H.-H.G.;PARK, K.M., 2014), culturas organoides/esferoides (TORISAWA, Y. S. et al, 2007, FENNEMA, E. et al, 2013, PINEDA, E.T. et al, 2013), arcabouços naturais ou personalizados (GAUVIN, R. et al, 2012; FIERZ, F. C. et al, 2008; SURI, S.; SCHMIDT, C.E., 2010) e folhas de células multicamadas (HARAGUCHI, Y., et al, 2012) , o que oferece modelos, com um conjunto único de vantagens, dependendo do tipo de experimento que está sendo realizado; podendo ser aplicada de diversas formas como na pesquisa de câncer e descoberta de medicamentos (JENSEN, C.; TENG, Y., 2020).

O Quadro 3 a seguir, adaptado de Jensen Caleb e Teng Yong (2020), compara os suportes à base de hidrogel, de material duro polimérico, fibras de vidro hidrofílicas, levitação magnética e esferoides com revestimentos de fixação ultrabaixa.

Quadro 3 - Comparação entre suportes à base de hidrogel de material duro polimérico, fibras de vidro hidrofílicas, levitação magnética e esferoides com revestimentos de fixação ultrabaixa.

| Função | Preparação | Vantagens e aplicações |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Suporte à base de hidrogel | <ol style="list-style-type: none"> 1. A membrana extracelular (MEC) pode ser replicada (ANTONI et al. 2015); 2. Pode ser carregada com fluidos biológicos e água (ANTONI et al. 2015); 3. Pode ser osmorregulada (GODUGU et al, 2013). | <ol style="list-style-type: none"> 1. Os hidrogéis inteligentes podem responder a estímulos ambientais como mudanças de temperatura, pH, força iônica, radiação, metal, campo elétrico e mais (GODUGU et al., 2013); 2. Fluxo intestinal e transporte difusivo (LANGHANS, 2018); 3. Atuam como depósitos de drogas, barreiras de tecido, um sistema de entrega de moléculas bioativas que simula o processo reparador natural (FORSAN et al, 2004; SHERBINY e YACOUB, 2013). |
| Suporte à base de material polimérico duro | <ol style="list-style-type: none"> 1. As células são amadurecidas no andaime para modelar tumores ou tecidos (SHANTHA e HARDING, 2003); 2. As células são então cortadas em um diâmetro que se encaixe dentro de um determinado recipiente de teste (HOFFMAN 2001). | <ol style="list-style-type: none"> 1. Os procedimentos de tratamento de células são muito semelhantes à cultura de células 2D (HOFFMAN, 2001); 2. Reproduzível (COSTA et al., 2016); 3. Tumoróides cultivados com amostras de pacientes mostram sinais promissores para triagem e desenvolvimento de drogas (PEPPA et al., 2000); 4. Regeneração de tecido ósseo, ligamentos, cartilagem, músculo esquelético e vascular e tecido do sistema nervoso central (HAYOCOCK, 2011). |
| Fibra de vidro hidrófila | <ol style="list-style-type: none"> 1. Normalmente realizado usando o dispositivo de guia SeedEZTM de Lena Biosciences; 2. As culturas de células 3D serão mais consistentes em forma, propagação, espessura e distribuição de células nas dimensões X, Y e Z (CUSHING e ANSETH, 2007). | <ol style="list-style-type: none"> 1. Pode realizar experimentos de cultura local, culturas de células mistas, experimentos de suspensão de gel de estado sólido, métodos de co-cultura com contato e sem contato através das técnicas de camada de alimentação tridimensional, experimentos de empilhamento e cultura, e culturas lado a lado (CASTING e ANSETH, 2007); 2. Podem ser células primárias, células secundárias e linhas celulares de várias origens e fontes (CUSHING e ANSETH, 2007); 3. Pode cultivar modelos 3D avançados de tumor <i>in vitro</i> por longos períodos de tempo. (CUSHING e ANSETH, 2007). |

| Função | Preparação | Vantagens e aplicações |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Levitação magnética | <p>1. As forças magnéticas permitem a agregação de células enquanto induzem a síntese da MEC (GODUGU, et al 2013);</p> <p>2. Promove a interação célula-célula (GODUGU, et al, 2013).</p> | <p>1. Não requer um meio específico (TALUKDAR e KUNDU, 2012);</p> <p>2. Trabalha com técnicas comuns de cultura de células 2D (TUKDAR e KUNDU, 2012);</p> <p>3. Trabalha com uma ampla gama de tipos de células (SOUZA et al., 2010);</p> <p>4. Não é limitado apenas a placas de 96 poços (ACTINE et al. 2018);</p> <p>5. Demora cerca de 16 h para que os esferoides sejam formados (TALUKDUIR e KUNDU, 2012);</p> <p>6. Pode formar uma cultura 3D sem o uso de um substrato de proteína artificial (TAUKAR e KUNDU, 2013);</p> <p>7. Pode sintetizar MEC durante a formação (TALUKAR e KUNDU, 2012).</p> |
| Microplacas esferoides com revestimento de fixação ultrabaixo | <p>1. O revestimento de fixação ultrabaixo reduz a aderência das células para promover a formação de esferoides (CHANDAYUTLU et al, 2011).</p> | <p>1. Normalmente feito de poliestireno e tratado com revestimentos hidrofílicos ou hidrofóbicos ou feito com polímeros naturais, como agarose (HAISIOR et al, 2015);</p> <p>2. Os poços de fundo em forma de V promovem a formação de esferoide consistente em todos os poços (DHANDAYUDHAPANI et al. 2011).</p> |

Fonte: Adaptada de Jensen Caleb e Teng Young (2020).

2.3.CULTURA DE CÉLULAS 3D PARA TRIAGEM DE FÁRMACOS

Como citado anteriormente, existe uma baixíssima taxa de sucesso dos medicamentos nos ensaios clínicos, especialmente nas fases II e III (LANGHANS, 2018), tanto em modelos animais, que ainda são de maior custo, quanto nos ensaios de cultura de células bidimensional (COSTA et al., 2016).

A compreensão da ligação entre célula-célula e célula-MEC é essencial para a descoberta de medicamentos (JENSEN, C.; TENG, Y., 2020). Esse fato que tornou a cultura de células 3D um dos principais métodos de escolha na descoberta de fármacos com atividade antitumoral, por proporcionar interações muito parecidas às células *in vivo* (LANGHANS, 2018). A estrutura da matriz pode alterar o mecanismo de ação de um medicamento, aumentando sua eficácia ou a resistência das células contra ele. Também têm as moléculas presente na MEC que consistem de proteína e de fatores de crescimento que regulam a proliferação, migração, diferenciação, adesão e sobrevivência celular, podendo ser moléculas de proteínas de matriz, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), de hepatócitos (HGF), derivado de plaquetas (PDGF), bem como outras proteínas secretadas e/ou sequestradas pela MEC (JENSEN, C.; TENG, Y., 2020).

Para que uma plataforma de triagem de fármacos seja dada como ideal e possa prever a eficácia do medicamento em determinada célula, um modelo de cultura 3D deve proporcionar um microambiente que permita de forma adequada a adesão, diferenciação, proliferação, migração e invasão celular (PEPPAS et al., 2006; LV et al., 2017).

Foi possível descobrir, através do perfil metabólico traçado para demonstrar a cooperação metabólica entre os tipos celulares, que as células da monocamada de cultura 2D é muito mais susceptível a serem mortas com o tratamento com drogas, enquanto que apenas algumas células da camada protetora de esferoides em ambiente 3D são afetadas (RUSSELL et al., 2017). Isso levou os pesquisadores a concluírem que no perfil metabólico da cultura 3D há uma redução de sensibilidade à ATP sintase, o que causaria essa distinção nos perfis metabólicos, levando à diferenças nas respostas aos quimioterápicos em 2D e 3D (FERRICK et al., 2008; TUNG et al., 2011).

Algumas matrizes comerciais como Matrigel® (Corning), Cultrex® (Sigma Aldrich) e Geltrex® (Thermo Fisher Scientific), que reproduzem o ambiente tumoral (KLEINMAN; MARTIN, 2005; LEE, G. Y. et al, 2007), têm sido utilizadas como suportes 3D de células

tumorais para o rastreamento de drogas anticâncer. Essas matrizes são de origem animal (sarcoma de rato) compostas principalmente por laminina, colágeno IV, entactina, e proteoglicanos de sulfato de heparano. No entanto, apesar dessas matrizes fornecerem pistas químicas e mecânicas essenciais para o comportamento celular, os resultados são frequentemente inconsistentes devido à variabilidade de lote para lote, composição química indefinida e manuseamento difícil do hidrogel, produzindo assim resultados inconclusivos, o que dificulta a padronização dos testes pré-clínicos (HUGHES; POSTOVIT; LAJOIE, 2010; KLEINMAN; MARTIN, 2005; PRESTWICH, G. D., 2007).

2.4.HIDROGÉIS

Alguns hidrogéis sintéticos têm sido desenvolvidos para serem usados como plataformas que permitem o crescimento de células tumorais, pois fornecem microambientes com características semelhantes às da MEC, permitindo a interação célula-célula e célula-matriz (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; MILLER et al., 2010). É o caso das matrizes 3D CellFate®, que são biomateriais, desenvolvidos pela empresa brasileira Biocelltis®, para o cultivo de células e tecidos humanos e animais em laboratório. Compostos por nanofibras poliméricas naturais de 50 a 100 nm de diâmetro, semelhantes ao colágeno humano, biocompatíveis e estéreis, prometem estar prontas para uso e ideais para cultivar células e tecidos humanos e animais em laboratório, permitindo o crescimento, diferenciação e funcionalização das células *in vitro* (BIOCELLTIS, S.I).

A membrana extracelular nativa possui consistência fibrosa composta por proteínas e fatores de crescimento que possuem, de forma complexa, funções que determinam o comportamento das células como diferenciação, proliferação, invasão e apoptose (KULAR; BASU; SHARMA, 2014), atuando como suporte mecânico e ambiente bioativo para as células (RHODES; SIMONS, 2007).

Compostos por cadeias poliméricas hidrofílicas reticuladas, os hidrogéis permitem retenções em sua estrutura tridimensional sem se dissolver e fornecem uma arquitetura 3D com microambiente dinâmico semelhante ao da MEC que mimetiza de forma mais eficiente os tecidos naturais, apresentando-se como alternativas de plataformas para o cultivo de células tumorais (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013).

Os hidrogéis possuem a capacidade de imitar a MEC, permitindo que os fatores solúveis sejam transportados através da sua matriz. São usados e preparados de formas bem versáteis, moldando-se às necessidades do experimento a ser realizado, podendo ser naturais,

feitos a partir de géis que são, geralmente, de polímeros naturais como quitosana, gelatina, matrigel, fibrinogênio, ácido hialurônico e alginato, ou sintéticos, normalmente feitos com polímeros sintéticos a partir de polietilenoglicol (PEG), ácido polilático (PLA) ou poliacetato de vinila (PVA) (LANGHANS, 2018; DHALIWAL, 2012).

As células são então incorporadas ao gel, permitindo a triagem de drogas com maior precisão, uma vez que se notou diferenças em relação às células cultivadas em monocamada 2D quanto à forma celular, densidade e sensibilidade às drogas estudadas (VAN-MINH et al., 2016). Essa técnica abriu a possibilidade de usar uma ferramenta para modelar tumores e órgãos para testar novos medicamentos e obter estratégias de tratamento com drogas especialmente na pesquisa do câncer, trazendo também novos horizontes aos especialistas que afirmam que a medida que os modelos 3D forem sendo aperfeiçoados, menos modelos animais precisarão ser usados para experimentos (JENSEN, C.; TENG, Y., 2020).

2.4.1. Modelo 3D de Nanocelulose Bacteriana – BNC

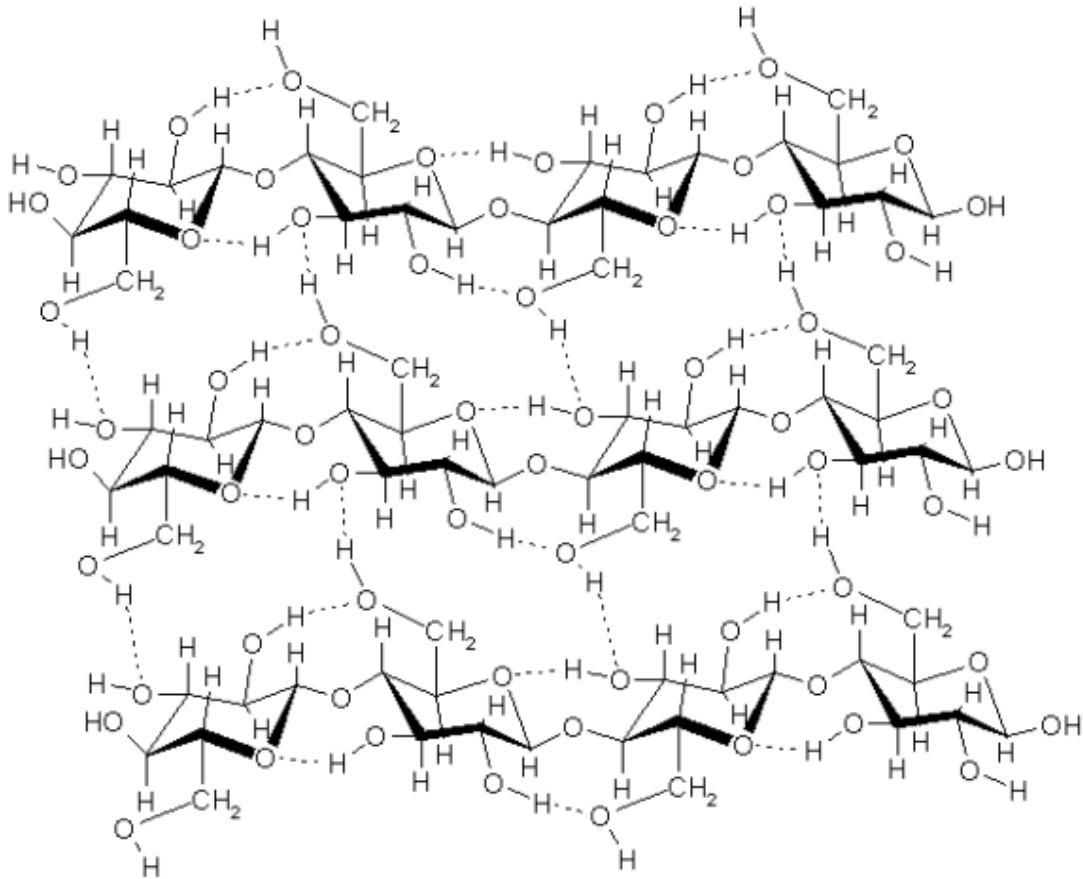
A celulose pode ser sintetizada por um grande número de microrganismos, alguns animais e pelas plantas, sendo assim um dos biopolímeros mais abundantes da natureza (CASTRO et al., 2011; CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004). Ela é um homopolímero natural e faz parte da composição da estrutura da parede celular de quase todas as plantas, de alguns tipos de algas e de muitos fungos, sob a fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$ (PARK; PARK; JUNG, 2003).

Os hidrogéis de nanocelulose são biomateriais moles que podem ser produzidos a partir de nanofibrilas de celulose bacteriana ou vegetal, sejam elas fibrilas (CNF), cristais (CNC) ou bacterianas (BNC), são todas hidrofílicas, renováveis, biodegradáveis e biocompatíveis, podendo ser quimicamente modificada com grupos funcionais ou por enxerto de biomoléculas (CURVELLO, R., 2019).

A nanocelulose bacteriana (BNC) é um polissacarídeo produzido por meio de vários métodos e técnicas de cultivo, na forma de hidrogel, por muitas espécies de bactérias, tais como as do gênero *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Rhizobium*, formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de β -D-glicose, unidas por ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas, composta por nanofibras hidrofílicas dispostas tridimensionalmente no meio (Figura 5), semelhante a MEC

nativa (PÉRTILE et al., 2012; RAMBO et al., 2008; MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2011; SANI; DAHMAN, 2010).

Figura 5 - Estrutura química da celulose.



Fonte: Recouvreux apud sameerrahatekar.org/Cellulose_Silk_IL.html.

São formadas em cultura estática e possuem uma estrutura de rede fibrosa ultrafina, contendo cerca de 99% de água (KLEMM et al., 2001; PÉRTILE et al., 2012), assemelhando-se à matriz extracelular (MEC) de tecido vivo, o que torna a BNC biocompatível com aplicabilidades robustas na indústria da saúde (HALIB, N. et al, 2019), sendo possível adaptar os hidrogéis conforme as especificidades de cada aplicação.

Dessa forma, duas superfícies distintas são formadas devido à disposição e densidade das fibras presente em ambos os lados da membrana, sendo a interface ar/líquido apresentada em uma densidade mais elevada de fibra e do lado oposto mostra uma menor densidade e uma superfície mais porosa (BERTI et al, 2013). A BNC não possui necessidade de tratamento químico e mecânico agressivo, pois, diferente da celulose vegetal, a síntese da celulose

bacteriana não possui lignina, hemicelulose ou pectina, podendo então ser purificada de forma simples por meio de uma solução de NaOH (HUANG et al, 2014).

A BNC é um biomaterial que possui características importantes para aplicação médica em engenharia de tecidos (COLLA; PORTO, 2014; CZAJA et al, 2007; KLEMM et al, 2001; RECOUVREUX et al, 2011; ZHIJIANG; GUANG, 2011), devido a uma alta resistência mecânica, capacidade de retenção de água (SHAH N., et al, 2013), excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade (UL-ISLAM, M. et al, 2012), flexibilidade, permeabilidade pronunciada a gases e líquidos, alta porosidade e área superficial, potencial de introdução e liberação de agentes antimicrobianos, medicamentos ou outros materiais biofuncionais, alta cristalinidade e arquitetura de rede ultrafina (HUANG, Y. et al, 2014; STUMPF, T.R. et al, 2018) e uma grande compatibilidade com tecidos vivos (CZAJA et al. 2006; KLEMM et al, 2011).

2.4.2. Aplicação da nanocelulose bacteriana - BNC

Nos últimos anos, o interesse pela funcionalidade de modo prático da celulose bacteriana aumentou consideravelmente devido o foco de atenção, liderado pela sustentabilidade, estar atrelada ao design de materiais naturais para uma ampla gama de aplicações (GREGORY, D. A. et al, 2021), portando, por ser um material puro, atóxico, com alta biocompatibilidade, fácil reprodutibilidade (CACICEDO, M. L. et al, 2015), permitindo adequação de suas funcionalidades, conforme direcionamento e objetivo de cada estudo, através de métodos de modificações químicas (introduzindo novos grupos funcionais), modificações físicas (usadas para alterar porosidades, cristalinidades e densidades de fibra) e modificações bioquímicas (através de enxerto de biomoléculas na superfície) (STUMPF, T.R. et al, 2018; COURTENAY, J.C. et al, 2018).

De acordo com Stumpf et al (2018) e Courtenay et al (2018) as duas estratégias principais para implementar essas modificações são, no geral, os métodos:

- *In situ*: que modifica a BNC durante a cultura de células bacterianas através da alteração da fonte de carbono ou variação das condições de cultura, com a adição de aditivos ou materiais que reforcem a cultura.
- *Ex situ*: que modifica a BNC após sua formação através de métodos químicos ou físicos.

A seguir, no Quadro 4, alguns trabalhos exemplificando os dois métodos.

Quadro 4- Estudos usando os métodos *in situ* e *ex situ* para modificação da BNC.

| MÉTODO | PESQUISA | REFERÊNCIA |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>In situ</i> | Síntese da nanocelulose bacteriana esférica como potencial de adsorção de prata para fins antimicrobianos | CESCA, K. et al, 2020. |
| | Formação e caracterização de partículas esféricas de celulose bacteriana | HU, Y.; CATCHMARK, J. M., 2011. |
| | Aplicação de nano-biomateriais para modificação <i>in situ</i> da estrutura de celulose bacteriana pela adição de HPMC durante a fermentação | HUANG, H.C. et al, 2011. |
| | Incorporação de extratos de <i>Aloe vera</i> em nanocelulose durante a biossíntese. | GODINHO, J.F. et al, 2016. |
| | Modificação <i>in situ</i> da estrutura da rede de celulose bacteriana adicionando substâncias interferentes durante a fermentação | HUANG, H.C. et al, 2010. |
| <i>Ex situ</i> | Membrana de nanocelulose bacteriana/poli (3-hidroxibutirato) | BARUD, H.S. et al, 2011. |
| | Matriz de hidrogel de nanocelulose bacteriana-IKVAV como modulador da adesão e proliferação de células tumorais de melanoma, induzindo o mimetismo vasculogênico <i>in vitro</i> . | REIS, E.M. et al, 2018. |
| | Celulose bacteriana modificada usando proteínas recombinantes para melhorar a adesão das células neuronais e mesenquimais | PÉRTILE, R. et al, 2012 |
| | Fabricação de filmes finos de celulose bacteriana a partir de nanofibrilas | TSALAGKAS, D. et al, 2016 |

Fonte: Arquivo próprio.

Com isso, muitos produtos baseados em BNC têm sido desenvolvidos para uso na engenharia de tecido ósseo, de cartilagem, osteocondral, da pele, engenharia de tecidos de vasos sanguíneos, engenharia de tecido neural, engenharia de tecido uretral e administração de medicamentos, destacando-se como andaimes e materiais curativos (EMRE OZ Y. et al, 2021).

No Quadro 5 são apresentadas algumas pesquisas utilizando a BNC para aplicações biomédicas que já foram elaboradas.

Quadro 5 - Aplicações biomédicas utilizando BNC.

| ÁREA | BIOMATERIAL DE BNC | REFERÊNCIAS |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Uretra | Reconstrução uretral. | BODIN, A. S. et al, 2010; LV, X.G. et al, 2018; HUANG, J.W. et al, 2015; WANG, B. et al, 2020. |
| Córnea | Biomaterial para córnea. | WANG, J.H. et al, 2010; JIA et al., 2009. |
| Laringe | Cirurgias de restituição da laringe | SOUZA et al., 2011. |
| Orelha | Implante de substituição. | MARTÍNEZ, A. H, et al 2014; NIMESKERN, L. et al, 2013. |
| Nariz | Implante de stent nasal. | FENG Z, et al, 2020. |
| Vasos sanguíneos | Desenvolvimento de vasos sanguíneos artificiais. | COLLA, G., PORTO, L. M., 2014; KLEMM et al., 2001; ANDRADE, F.K. et al, 2010; LI, X. et al. 2017. |
| Tecido ósseo | Crescimento de osteoblastos, formação de nódulos ósseos, impressão 3D, regeneração óssea. | HUTCHENS, S.A. et al, 2006; INGOLE, V.H. et al, 2019; TAZI, N. et al, 2012; ATILA, D. et al, 2019; LUZ, E. P. C. G. et al, 2020; CAKMAK, A. M. et al, 2020. |
| Pele | Substitutos temporários de pele; recuperação de ferimentos e queimaduras; curativos; regeneração de tecido. | CIECHANŠKA, 2004; CZAJA et al., 2006; CZAJA et al., 2007; SAJJAD, W. et al, 2020; SAJJAD, W. et al, 2019; LUO, Z. et al, 2020. |
| Tecido neural | Substrato para neurônios, culturas primárias de astrócitos, regeneração do tecido neural. | REBELO, A. et al, 2015; PÉRTILE, R et al, 2012; ALTUN, E. et al, 2019; GONÇALVES-PIMENTEL, C. et al, 2018. |
| Tecido osteocondral | Reparo de defeito osteocondral. | KUMBHAR, J.V. et al, 2017; ZHU, X. et al, 2018. |
| Sistema de liberação de fármacos | Sistemas de liberação de drogas e entrega de agentes terapêuticos. | BODHIBUKKANA, C. et al, 2006; STOICA-GUZUN, A. et al 2007; SILVA, N. H. C. S. et al, 2014; ALMEIDA, I. F. et al, 2014; CACICEDO, M. L. et al, 2015; CESCA, K. et al, 2014. |

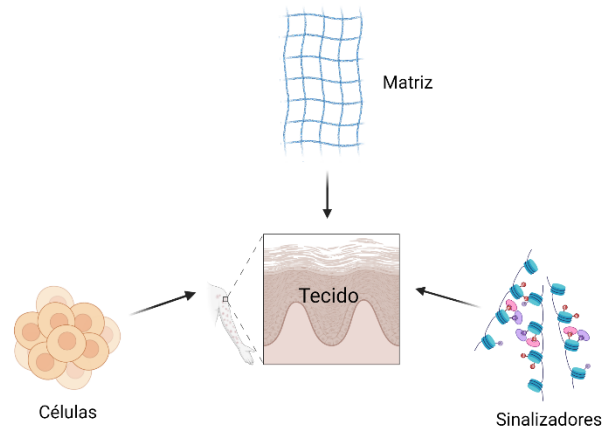
Fonte: Arquivo próprio.

Portanto, conforme apontado pelo Quadro 5, diferentes aplicações podem ser moduladas com celulose bacteriana, dependendo do seu propósito e aplicação.

2.4.3. Uso da BNC para triagem de fármacos

Os três principais componentes tradicionais que compõem a engenharia de tecidos são as células, as biomoléculas (sistema de sinalização) e o andaime (matriz) (McHALE, M.K. et al, 2019), esquematizado de forma simplificada na Figura 6. Assim sendo, diferentes linhas celulares podem ser usadas, tanto alogênicas, quanto autólogas. Essas últimas são obtidas do próprio paciente, ou seja, não induzem uma resposta do receptor (AGRAWAL, C. M. et al, 2014) podendo auxiliar fortemente nas descobertas de novas drogas e terapias antitumorais.

Figura 6 - Os componentes básicos que compõem a engenharia de tecidos.



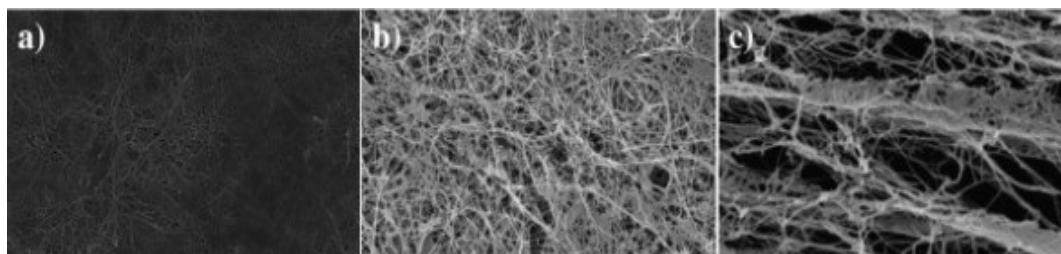
Fonte: Adaptado de McHale, M.K.; Bergmann, N.M.; West, J.L., (2019) feito com BioRender.com.

A celulose bacteriana não modificada tem propriedades únicas não exibidas por outros biomateriais (SHAH, N., et al., 2013). Contudo, seu potencial ainda não foi totalmente explorado. A maioria dos artigos publicados atualmente trata principalmente das modificações dos andaimes de BNC, introduzindo polímeros e/ou compostos orgânicos ou inorgânicos para suportar a fixação, proliferação e diferenciação celular (EMRE OZ, Y. et al, 2021).

Essas membranas são formadas na interface entre o ar e o meio de cultura, compostas por um gel resistente, conformável, semitransparente e macroscopicamente homogêneo. O lado superior, formado em contato com o ar, é composto por uma densa rede de fibras, enquanto o lado inferior, formado em contato com o líquido, exibe uma camada gelatinosa porosa (STUMPF, T.R. et al, 2013), conforme exibido na Figura 7.

Em sua pesquisa de análise *in vitro* das células do músculo liso humano (SMC) em celulose bacteriana, Bäckdahl et al (2006) afirmam que não há nenhuma diferença significativa na taxa de proliferação em ambos os lados da BNC. Contudo, sua morfologia e migração mostraram-se diferentes. Enquanto no lado poroso as células migraram em até 10 μm para a rede fibrosa após 2 semanas de cultura, nenhum crescimento interno de células foi detectado do lado compacto.

Figura 7 -Micrografias MEV do liofilizado da membrana nos lados (a) superior e (b) inferior com ampliação de 5000 ×; e (c) visualização no plano sagital com ampliação de 10000 ×.



Fonte: Stumpf et al, 2013.

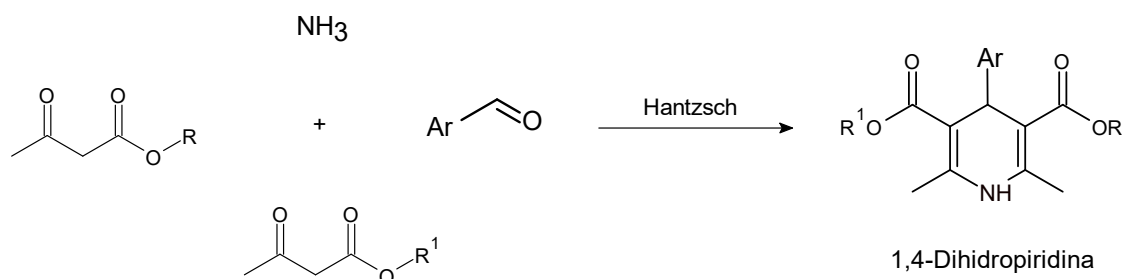
Existem muitos estudos *in situ* e *ex situ* da nanocelulose bacteriana e suas modificações (COURTENAY, J.C et al, 2018) conforme visto anteriormente (Quadro 4). No entanto, não há registro de pesquisas com foco na triagem de fármacos antitumorais que utilizem esse biomaterial como arcabouço 3D.

2.5.A 1,4-DIHIIDROPIRIDINA (DHP) NA BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

2.5.1.O que são compostos DHP?

Os compostos DHPs ou 1,4-dihidropiridinassão uma das mais relevantes reações multicomponentes (RMC) para indústria farmacêutica. Reportada por Arthur Rudolf Hantzsch (Figura 8) em 1882, são reações caracterizadas pela síntese *one-pot*, ou seja, ocorrem em único frasco reacional a partir de um ou mais reagentes diferentes de modo que a maioria dos átomos envolvidos nesses reagentes estejam presentes no produto final (HANTZSCH, 1882; BOSSERT et al, 1989; ROGERIO, K. et al, 2016).

Figura 8- Esquema geral da reação de Hantzsch.



Fonte: Adaptado de Li, 2006.

Os bloqueadores dos canais de cálcio representam um grupo heterogêneo de drogas e existem quatro famílias na prática clínica sendo os diidropiridínicos uma delas (OIGMAN, W.; FRITSCH, M. T., 1998). É uma classe de agentes bloqueadores por possuírem a capacidade de suprimir a ação dos canais de íons de Ca^{2+} dependentes de voltagem, nas membranas celulares (DOCAMPO, R.; VERCESI, A.E.; HUANG, G., 2014).

Eles vêm sendo estudados como bloqueadores desse canal (BCC) para combater doenças parasitárias (PALIT, P; ALI, N, 2008; REIMÃO, J.Q.; TEMPONE, A.G., 2011; TEMPONE, A.G.; TANIWAKI, N.N.; REIMÃO, J.Q., 2009) e comumente usadas para o tratamento de doenças cardiovasculares (SICA, 2006; YAMAKAGE; NAMIKI, 2002). Em resumo, o núcleo DHP provou ser um arcabouço farmacologicamente privilegiado por exibir diversas atividades biológicas com propriedades antioxidantes, anticonvulsivantes (PRASANTHI, G.; PRASAD, K.; BHARATHI, K., 2013, 2014; SADDALA et al, 2017), anti-inflamatórias (ULLOORA et al, 2013; EISSA; FARAG; SOLIMAN, 2009), antidiabéticas (NIAZ, H. et al, 2015; PRAVEENKUMAR, E. et al, 2019; YOUSUF, H. et al, 2020), antituberculares (EDRAKI et al, 2009; MOGHADAM et al, 2006 ; SAINI et al, 2008) e anticâncer (VALENTE, S. et al, 2016; MOHAMED, M.F. et al, 2016; MOHAMED, M.F. et al., 2018) apresentando efeitos reversos da resistência (MDR) em algumas células cancerosas (COBURGER et al., 2010; EDRAKI et al., 2009; FIRUZI et al., 2013; HILGEROTH et al., 2013), bem como no manejo da doença de Alzheimer (ARRIBAS; MALEK; PALOMINO, 2019).

A piridina possui vários análogos que são dotados de atividades promissoras, sendo um único composto ou em combinação com outras drogas (REIMÃO, J.Q.; TEMPONE, A.G., 2011). A própria droga pode sofrer alguma hemissíntese ou pode inspirar a preparação de análogos em ensaios de reaproveitamento, como foi o caso do derivado semissintético

da artemisinina, dihidroartemisinina, usado para o tratamento da malária, que é dotado de atividade promissora contra as células de melanoma metastático humano (SUNDAR, S.; OLLIARO, P.L., 2007).

2.5.2. Por que usar um bloqueador de transporte de Ca^{2+}

Alguns cânceres estão associados a alterações em canais ou bombas de íons de cálcio (Ca^{2+}) específicos, pois o relevante aumento da expressão desses canais no câncer está diretamente relacionado a incidência tumorigênica das vias reguladas pelo Ca^{2+} (MONTEITH, G. R. et al, 2007).

Na última década, tem havido uma maior consciência da complexidade da sinalização fisiológica do Ca^{2+} e sua percepção quanto aos cânceres (BERRIDGE, M.J., 2001; FENG, M.Y.; RAO, R., 2013; RIZZUTO, R.; POZZAN, T., 2006). Isso levou à proposta de que muitos desses canais, bombas e trocadores, podem ser alvos de drogas para a terapêutica oncológica (MONTEITH, G. R. et al, 2007).

Mesmo o Ca^{2+} sendo um sinal celular ubíquo, as alterações nessas sinalizações podem afetar diferencialmente células cancerosas específicas, tendo uma distribuição altamente restrita nos seus tecidos, ao contrário de muitos dos alvos potenciais de drogas anticâncer expressos de forma onipresente, como reguladores do ciclo celular (COOK, S.J.; RODERICK, H.L., 2008; MONTEITH, G.R., 2017).

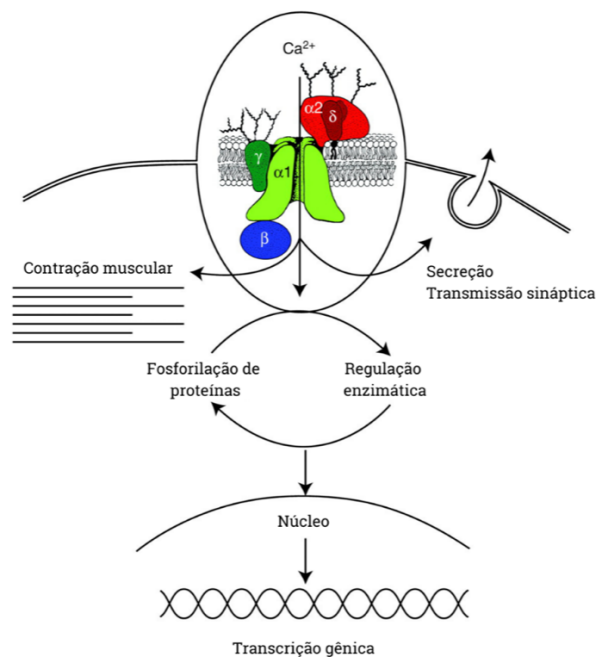
A capacidade do Ca^{2+} de regular a morte e a proliferação celular, combinada com o potencial de modulação farmacológica, oferece a oportunidade para um conjunto de novos alvos de drogas no câncer (AL-SAID, M.S. et al, 2011; BAZARGAN, L. et al, 2007; ISLAM, F. et al, 2021; SIDHOM, P. A. et al, 2021). Muitas pesquisas têm deliberado sobre o efeito anticâncer das 1,4-dihidropiridina e quase todos correlacionaram o poder anticâncer com a interrupção da multirresistência (MDR), a principal causa do fracasso da quimioterapia (BAUMERT, C. et al, 2013; COBURGER, C. et al, 2010; HULUBEI, V. et al, 2012; RADADIYA, A. et al, 2014; SIRISHA, K. et al, 2011; SHAHRAKI, O. et al, 2018; SHEKARI, F. et al, 2015).

Algumas vias de sinalização mediadas por Ca^{2+} estão implicadas na tumorigênese e progressão tumoral, como metástase, invasão e angiogênese. O papel dos íons de cálcio na proliferação e apoptose significa que ambos os inibidores (como no caso dos DHPs) e os ativadores dessas proteínas são potenciais agentes terapêuticos na quimioterapia do câncer. Em

resumo, a proliferação celular precisa de alta concentração intracelular de Ca^{2+} , ou seja, a tentativa de diminuir a quantidade desse íon cessaria a cascata da tumorigênese (MONTEITH, G.R. et al, 2007).

Como antagonistas dos canais de cálcio, os DHPs são um grupo de drogas com locais e mecanismos de ação muito explorados nas últimas décadas que exercem sua atividade farmacológica nativa modulando o influxo de Ca^{2+} . Esses canais de Ca^{2+} (CaVs) são proteínas complexas, compostas por quatro ou cinco subunidades distintas (α_1 , $\alpha_2\delta$, β_{1-4} e γ), como mostrado na Figura 9, codificadas por múltiplos genes; são canais iônicos controlado por voltagem, caracterizada pela longa ação da corrente elétrica produzida pela entrada de cálcio na célula. Eles são presentes na membrana da maioria das células excitáveis com suas interações atuando na subunidade α_1 (ela forma os poros e fornece o (s) sítio (s) de ligação para praticamente todos os agonistas e antagonistas). Tendo expressão muito difundida no sistema cardiovascular e endócrino, nos neurônios e no músculo esquelético (IOAN, P. et al, 2011; CATTERALL et al, 2021).

Figura 9- Subunidades de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.



Fonte: Adaptado de Catterall (2011).

As correntes de cálcio do tipo L são ativadas por alta voltagem, por isso são os canais sensíveis aos DHPs, o que os tornou ferramentas moleculares valiosas para classificação e localização desses canais (WANG M. et al, 2021).

Das 10 subunidades α_1 clonadas, 4 são do tipo L ($\text{Ca}_v 1.x$) com quatro repetições

homólogas (Ca v 1.1, Ca v 1.2, Ca v 1.3 e Ca v 1.4). Cada repetição tem seis domínios que são proteínas transmembranares (S1-S6), ativadas por despolarização do potencial de membrana, e uma região de formação de poros entre S5 e S6 (CATTERALL et al, 2021). O Quadro 6 expõe especificidades das repetições homólogosdo tipo L.

Quadro 6- Características das quatro repetições homólogas do tipo L da subunidade α_1 .

| Nomenclatura | Cav1.1 | Cav1.2 | Cav1.3 | Cav1.4 |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Nome alternativo | Tipo L α_{1S} músculo esquelético L | Tipo L α_{1C} músculo liso ou cardíaco L | Tipo L α_{1D} | Tipo L α_{1F} |
| Ativadores | S(-)-BayK8644 SZ(+)-(S)-202-791 FPL64176 | S(-)-BayK8644 SZ(+)-(S)-202-791 FPL64176 | S(-)-BayK8644 | S(-)-BayK8644 |
| Antagonistas específicos (bloqueadores) | Dihidropiridinas, fenilalquilaminas, benzotiazepínicos | Dihidropiridinas, fenilalquilaminas, benzotiazepínicos | Dihidropiridinas, fenilalquilaminas, benzotiazepínicos | Dihidropiridinas (baixa afinidade) |
| Funções celulares | Alternância excitação- contração; acoplamento excitação-transcrição | Alternância excitação-contração; liberação de hormônio; regulação da transcrição; integração sináptica | Liberação de hormônio; regulação da transcrição; regulação sináptica; marcapasso cardíaco; audição; liberação de neurotransmissor de células sensoriais | Liberação de neurotransmissor de fotorreceptores |
| Expressão tecidual | Músculo esquelético; túbulos transversais | Miócitos cardíacos; miócitos de músculo liso; células endócrinas; corpos celulares neuronais; dentritos proximais | Células endócrinas; corpos celulares neuronais e dentritos; miócitos atriais cardíacos e células marcapasso; células ciliadas cocleares | Bastão retinal e células bipolares |

Fonte: Adaptado de Catterall et al (2021).

De acordo com Schönherr (2005), o complexo processo de formação de tumores tem sido promovido a partir de propostas de proteínas do canal através de vários mecanismos. Essa função fisiopatológica é uma das novas áreas de pesquisa mais interessantes para os cientistas que trabalham com canais iônicos e promete novas estratégias terapêuticas no combate ao câncer (SCHÖNHERR, R., 2005). Com isso, a relevância clínica dos canais iônicos para diagnóstico e terapia do câncer tem sido estudada, uma vez que os canais iônicos de membranas são essenciais para a proliferação celular e parecem ter um papel no desenvolvimento do câncer (KUNZELMANN, K., 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.MATERIAIS

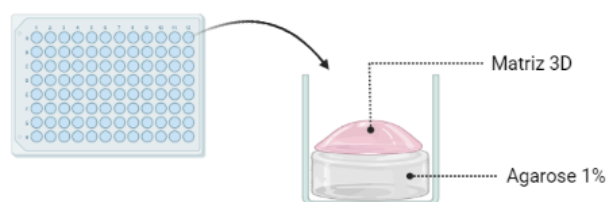
As matrizes tridimensionais de celulose bacteriana utilizadas nesse estudo foram de dois tipos distintos de CellFate® disponibilizadas pela empresa Biocelltis Biotecnologia®, a CellFate® pura e a CellFate® modificada com colágeno. Para as determinações de citotoxicidade *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular padrão de fibroblasto isolado de camundongo L929 (linhagem celular murina imortalizada de fibroblastos) (Thermo Scientific, Brasil) e três linhagens tumorais: carcinoma de pulmão A549, melanoma humano SKMEL-28 e glioma murino GL261. Para o cultivo das células foi usado o meio Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM (Gibco® – Invitrogen), soro fetal bovino (Gibco® – Invitrogen), bicarbonato de sódio (Na₂CO₃; Sigma – Aldrich) e penicilina/estreptomicina (pens/strep; Gibco® – Invitrogen). O ensaio MTS (Promega Corporation, EUA) e o glutaraldeído (Sinth) também foram utilizados.

3.2.MÉTODOS

3.2.1.Montagem das placas com agarose para as matrizes CellFate®

Para que as células ficassem aderidas apenas na matriz, utilizou-se agarose 1%, feita a partir de 50 mL de água MilliQ com 1g de Agarose (AGR-LE-100), para revestir o fundo dos poços das placas. Após a solubilização e aquecimento, foi adicionado 100 µL em cada poço da placa de 96 poços e após seu resfriamento, as membranas dos respectivos ensaios foram colocadas com a superfície a ser usada para o cultivo voltada para cima (Figura 10) e adicionado meio DMEM até sua total imersão. Completado o processo, a placa foi fechada e vedada com parafilme e deixada *overnight* na geladeira. Cerca de duas horas antes do uso, a placa foi passada para a estufa a 37 °C.

Figura 10 - Esquema placa/ agarose/ membrana



Fonte: Arquivo próprio feito com BioRender.com

3.2.2. Síntese e solubilização dos compostos

Quatorze (14) compostos análogos de DHP, descritos no Quadro 7, foram sintetizados e doados pelo Grupo de Estudo de Produtos Naturais e Sintéticos (GEPRONAS) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

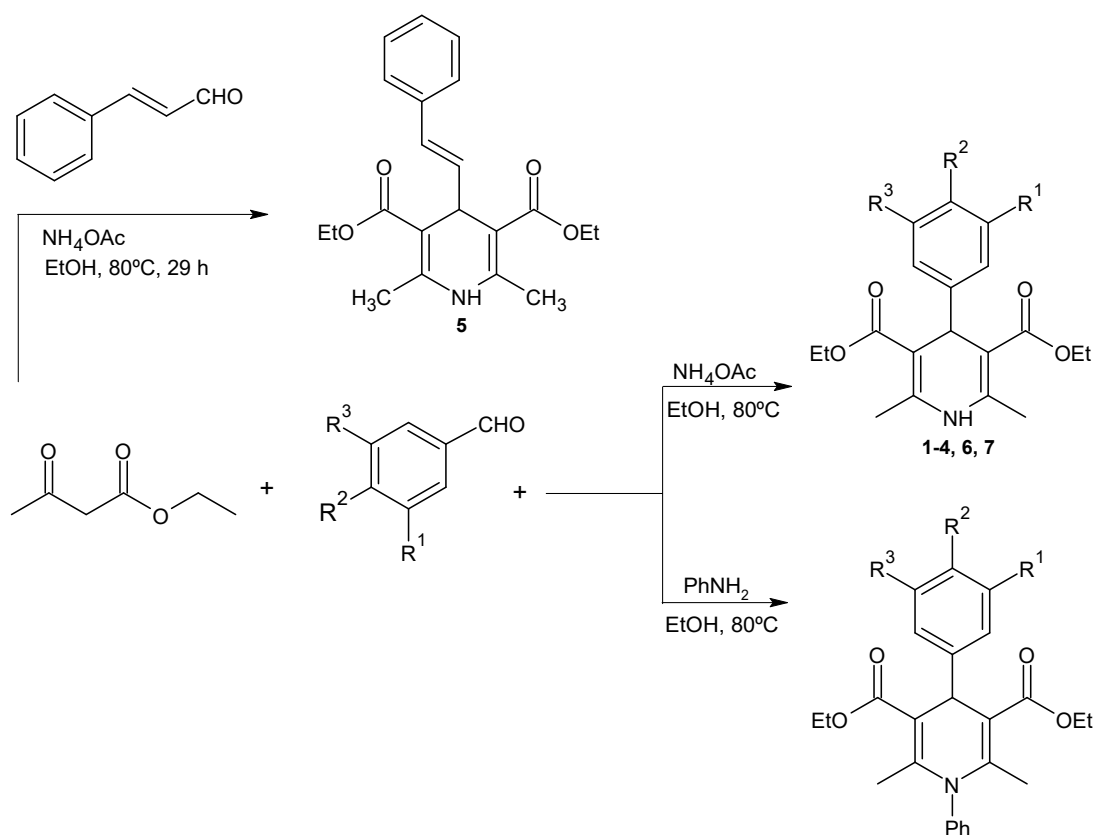
Quadro 7- Descrição dos compostos análogos do DHP utilizados nesse trabalho.

| Código | Amostra |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C1 | Dietil 4- (3,4-dimetoxifenil) -2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C2 | Dietil 2,6-dimetil-4- (4-nitrofenil) -1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C3 | Dietil 2,6-dimetil-4- (4-hidroxifenil) -1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C4 | Dietil 4- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C5 | (E) -dietil 2,6-dimetil-4-estiril-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C6 | Dietil 2,6-dimetil-4- (3,4,5-trimetoxifenil) -1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C7 | Dietil 4- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C8 | Dietil-4- (4-clorofenil) -2,6-dimetil-1-fenil-1,4-di-hidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C9 | Dietil 4- (4-bromofenil) -2,6-dimetil-1-fenil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C10 | Dietil 4- (4-hidroxifenil) -2,6-dimetil-1-fenil-1,4-di-hidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C11 | Dietil 2,6-dimetil-1-fenil-4- (3,4,5-trimetoxifenil) -1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C12 | Dietil 4- (3,4-dimetoxifenil) -2,6-dimetil-1-fenil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C13 | Dietil 4- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -2,6-dimetil-1-fenil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato |
| C14 | Dietil 4- (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) -2,6-dimetil-1-fenil-1,4-di-hidro piridina-3,5-dicarboxilato |

Fonte: Arquivo próprio

Os compostos do Quadro 7 foram diluídos em 200 μ L de DMSO formando a solução-mãe de cada composto em suas respectivas concentrações, na grandeza de μ M. Partindo dessa solução-mãe, pôde-se fazer diluições em meio de cultura (DMEM), de acordo com as concentrações desejadas, para, posteriormente, a solução de cada composto, em sua(s) devida(s) concentração(ões), ser aplicada diretamente sobre as células cultivadas. A síntese dos compostos do Quadro 7 foi realizada conforme relatado anteriormente por Pollo et al. (2017) com a via de síntese ilustrada na Figura 11.

Figura 11 - Via de síntese dos compostos 1 ao 14.



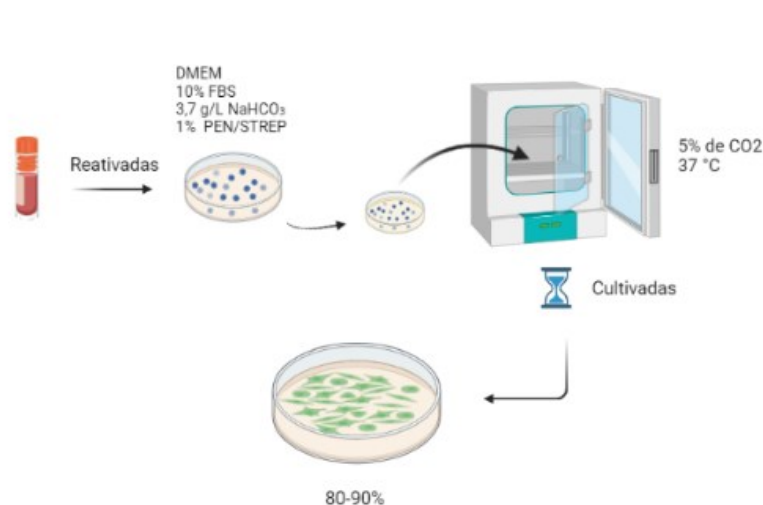
| Compostos | R^1 | R^2 | R^3 | Compostos | R^1 | R^2 | R^3 |
|-----------|--------------|---------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| NH | | | | NPh | | | |
| 1 | OMe | OMe | H | 8 | H | Cl | H |
| 2 | H | NO_2 | H | 9 | H | Br | H |
| 3 | H | OH | H | 10 | H | OH | H |
| 4 | OMe | OH | H | 11 | OMe | OMe | OMe |
| 6 | OMe | OMe | OMe | 12 | OMe | OMe | H |
| 7 | OMe | OH | OMe | 13 | OMe | OH | H |
| | | | | 14 | OMe | OH | OMe |

Fonte: Adaptado de Pollo et al., 2017.

3.2.3. Tratamento das células com os compostos

As células do tipo L929, GL261, SK-MEL-28 e A549 foram descongeladas do meio criogênico e cultivadas em placas de cultura de células (Figura 12) contendo meio Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM (Gibco® – Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® – Invitrogen), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma – Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco® – Invitrogen).

Figura 12-Reativação das células

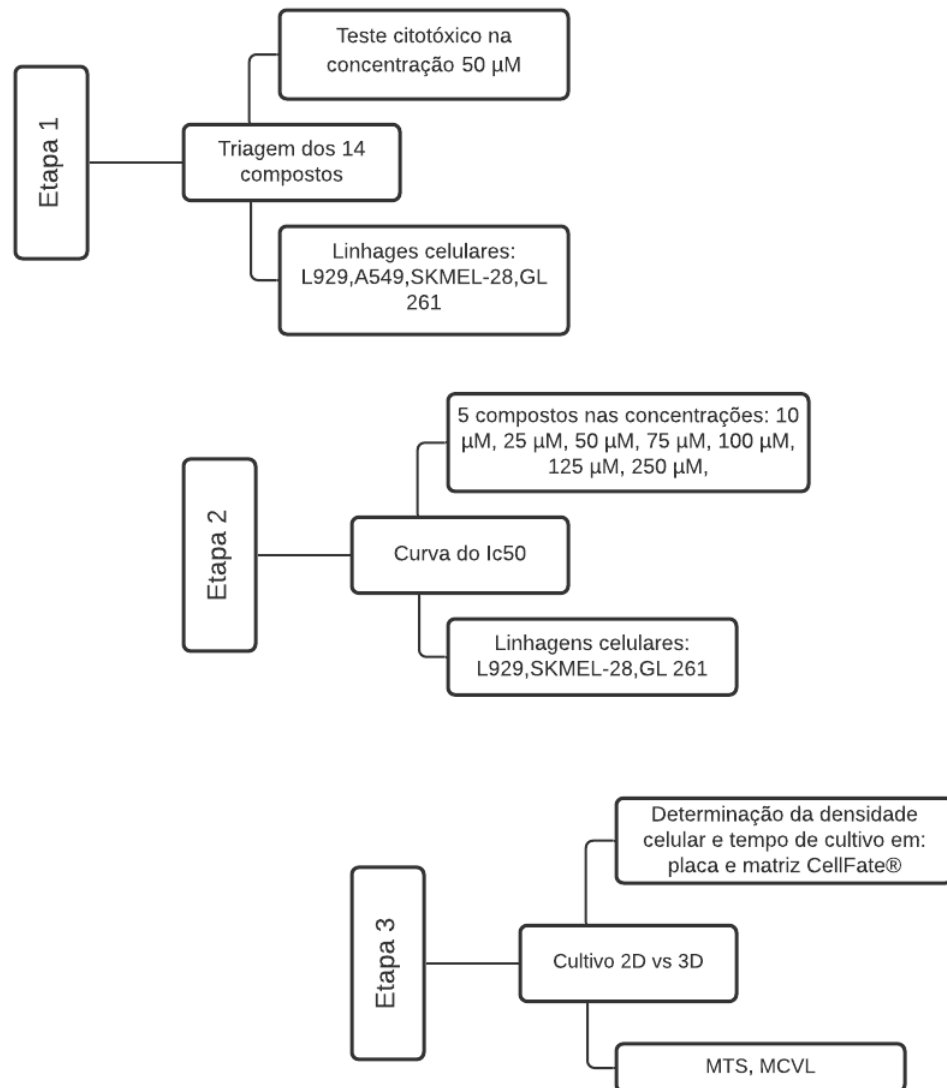


Fonte: Arquivo próprio feito com BioRender.com

Todas as linhagens celulares foram mantidas na incubadora (MCO-170AICUVL-PA – Panasonic) com atmosfera de 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C, até atingirem confluência de 80-90%, para então serem utilizadas nos experimentos.

O tratamento das células foi dividido em três etapas e estão expostas a seguir na ordem cronológica de elaboração (Figura 13).

Figura 13 - Fluxograma das etapas dos ensaios realizados



Fonte: Arquivo próprio

3.2.3.1. Etapa 1 – Triagem dos Compostos

Os compostos DHPs foram primeiramente selecionados em uma triagem, na qual foi avaliado quais compostos eram citotóxicos sob a concentração de 50 µM, segundo a International Organization for Standardization (ISO 10993-5 Avaliação biológica de dispositivos médicos — Parte 5: Testes de citotoxicidade in vitro, terceira edição de 2009).

Em placas de 96 poços, as linhagens celulares foram semeadas na densidade de 10.000 células por poço e mantidas na incubadora (MCO-170AICUVL-PA - Panasonic) com atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e os compostos do Quadro 7 foram adicionados em uma concentração padrão de

50 μ M por poço, mantendo as triplicatas de três controles: um positivo (doxorubicina, 10 μ M), um dos agentes anticancerígenos mais eficazes utilizada como droga de referência neste estudo, e dois negativos (meio de cultivo e meio + DMSO 0,5%). Decorridas 24 horas, foi feito o teste de viabilidade celular conforme o item **3.2.4.1** com o objetivo de selecionar os compostos que reduziram por volta de 50% da atividade metabólica das células. Seus respectivos resultados estão expostos na Figura 19.

3.2.3.2. Etapa 2- Identificação da concentração inibitória absoluta (IC50)

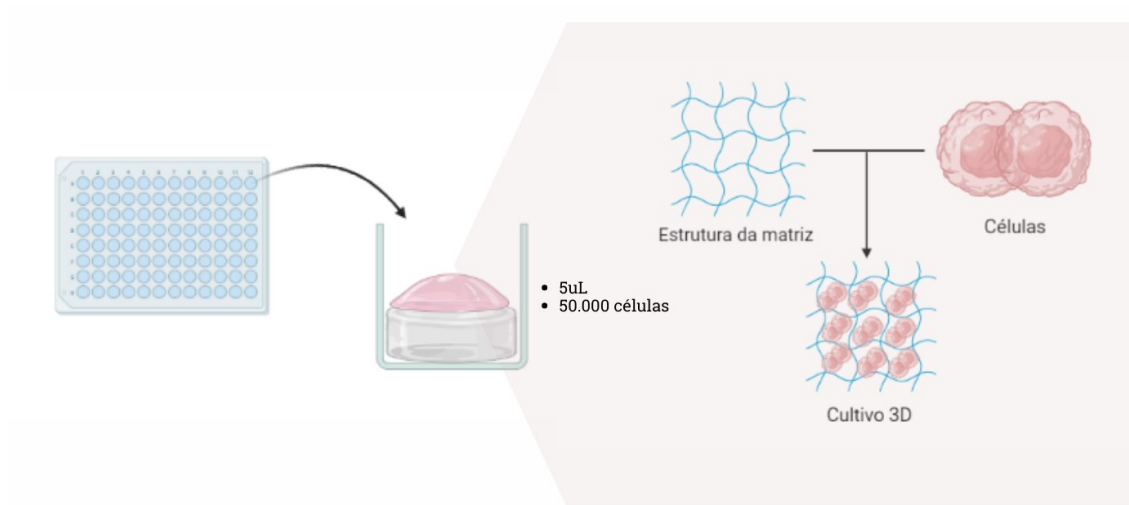
Para determinação da concentração inibitória absoluta, o plaqueamento das células e condição de cultivo foram iguais ao descrito na Etapa 1. Após 24 horas de cultivo, o meio foi removido e os compostos selecionados na Etapa 1 (Figura 19) foram adicionados em triplicata para as concentrações de 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 250 μ M. O teste de viabilidade celular do item **3.2.4.1** foi feito com o objetivo de identificar a concentração inibitória absoluta (medida quantitativa de uma determinada substância que é necessária para inibir um processo biológico pela metade, tendo como referência o controle), ou seja, o valor do IC50 de cada composto para cada célula, conforme mostrado na Figura 20.

3.2.3.3. Etapa 3- Comparação da triagem em cultivo 2D vs 3D

Com a definição do IC50 de cada composto em relação a cada tipo celular, os compostos para essa etapa (CP2, CP10 e CP14) foram selecionados. Foi feito então o cultivo prévio para determinação da densidade celular em placa e na plataforma 3D (matriz CellFate®). Na sequência, a concentração de cada composto foi avaliada para as três células que seguiram para essa etapa, L929, SKMEL-28 e GL261. As caracterizações de viabilidade celular por MTS e morfológica de autofluorescência por MCVL foram executadas conforme mostradas em seus respectivos itens **3.2.4.1** e **3.2.4.2**.

Para avaliação da concentração citotóxica em 2D vs 3D, todo o meio de cultivo, previamente adicionado às placas montadas no item **3.2.1**, foi cuidadosamente removido de cada poço. A suspensão celular foi preparada e as células foram semeadas sobre as membranas (Figura 14) em um volume de 5 μ L contendo concentração de 50.000 células/membrana.

Figura 14 - Desenho ilustrativo da sementeira das células sobre as membranas.

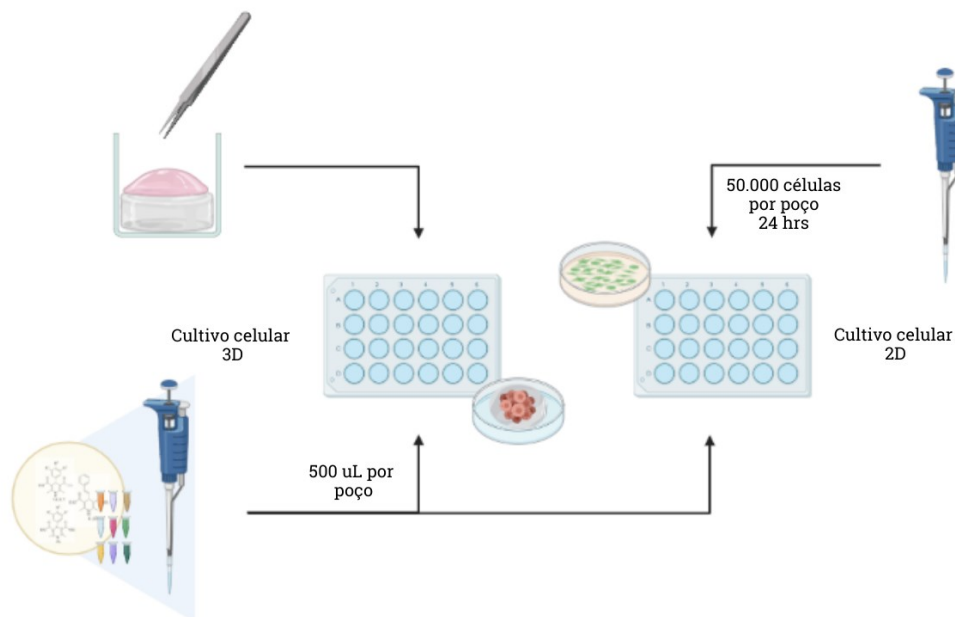


Fonte: Arquivo próprio feito com BioRender.com.

Em seguida, as placas foram postas na incubadora de CO₂ por 4 horas para adesão das células na membrana. Após as células estarem aderidas, o volume do meio de cultivo foi adicionado até total imersão das membranas sendo trocado a cada 24 horas durante 3 dias (72 horas) antes da adição dos compostos. Após as 72 horas de cultivo, as membranas foram passadas para placas de 24 poços e 500µL (Figura 15) da solução com o respectivo composto foi adicionado.

O plaqueamento 2D foi feito 24 horas antes de completar as 72 horas de cultivo nas membranas, também na densidade de 50.000 células por poço, e então seguiu para adição dos compostos.

Figura 15–Adição dos compostos sobre os cultivos celulares em 2D e 3D.



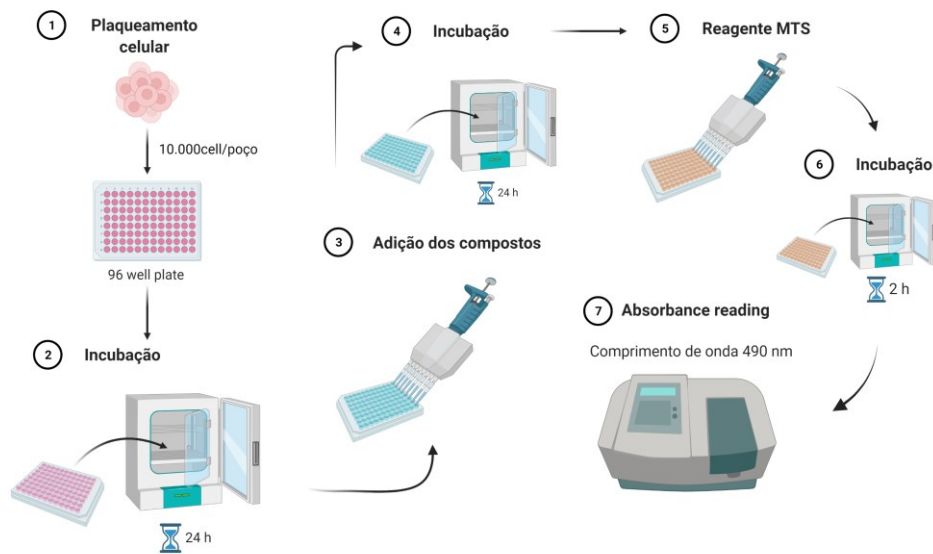
Fonte: Arquivo próprio feito com BioRender.com.

3.2.4.Caracterização

3.2.4.1.Viabilidade celular por MTS

A viabilidade celular em 2D e 3D foi medida no ensaio de MTS [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazólio], que avaliou a atividade metabólica celular. Para isto, o meio foi removido e, então, adicionado 100 μ L de meio de cultura (cada linhagem com seu respectivo meio, sem adição de nenhuma substância) e 20 μ L do reagente de MTS em cada poço. As células foram mantidas na incubadora (MCO-170AICUVL-PA – Panasonic) com atmosfera de 5% de CO_2 e a temperatura de 37 $^\circ\text{C}$ por 2 horas. Em seguida, 100 μ L de sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e a leitura de absorbância foi realizada no comprimento de onda de 490/630nm (Figura 16).

Figura 16- Esquema simplificado do teste de viabilidade celular – MTS.



Fonte: Arquivo próprio feito com BioRender.com.

3.2.4.2. Autofluorescência por MCVL

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) foi utilizada para avaliar a distribuição das células nas matrizes. As amostras em 2D, em BNC pura e em CellFate® contendo as células foram primeiramente fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e então imersas em Triton-X100 0,1% por 3 minutos e lavadas com PBS novamente. Seguindo para o coramento que se deu com 5µL de Faloídina em BSA 1% em um período de 20 minutos protegidos da luz e lavados com PBS. Em seguida, foi efetuado o coramento com a DAPI através da inoculação das amostras por 30 segundos em solução de 1µL de DAPI em 999µL de PBS, seguindo para lavagem com Tween 20 e mais uma lavagem em PBS. Após esse coramento com DAPI e faloídina, as amostras foram examinadas por MCVL (Leica TCS SP5, Alemanha). Imagens de 8 bits usando quatro detectores de sinais fluorescentes e um detector de transmissão de imagens de campo claro foram coletadas em objetiva de 20× (HCX PL APO CS 1,40 OIL UV) e uma banda de emissão de início/fim de 415/485 nm, respectivamente. Software Leica Application Suite (LAS AF) foi utilizado para controlar a fluorescência do microscópio e posterior análise das imagens.

3.2.5. Análise de dados

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o *software* estatístico *Origin* versão 8.5. Os resultados experimentais foram expressos como a média \pm erro padrão e comparados por análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey considerando-os estatisticamente diferentes para $p \leq 0,05$.

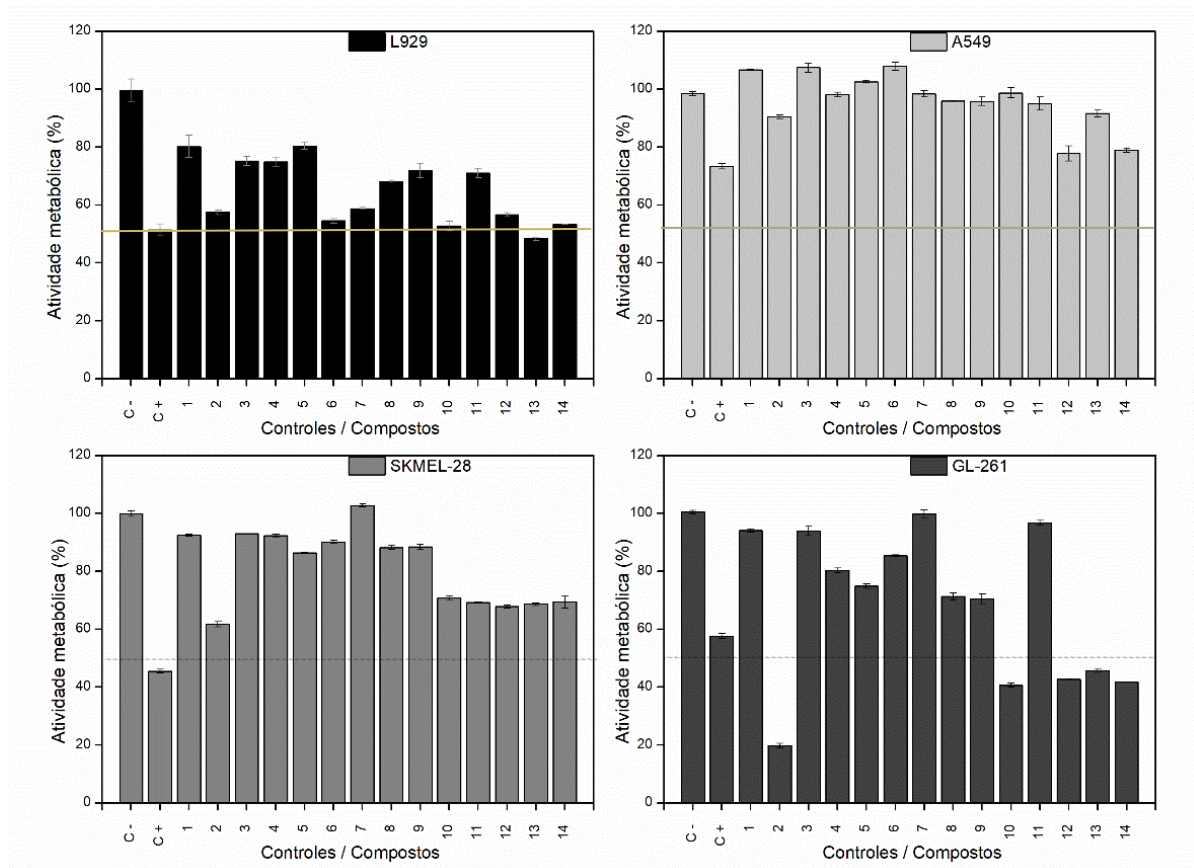
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das três etapas metodológicas estão expostos a seguir na ordem cronológica de elaboração. Na etapa 1 tem-se a triagem dos compostos, na etapa 2 a identificação da concentração inibitória absoluta e na etapa 3 a comparação da triagem em cultivo 2D vs 3D.

4.1. ETAPA 1- TRIAGEM DOS COMPOSTOS

A seleção prévia dos compostos DPH com capacidade de reduzir a atividade metabólica das células em cultura 2D foi avaliada e apresentada na Figura 17.

Figura 17 - Atividade metabólica das linhagens L929, A549, SKMEL-28 e GL261 após tratamento com os 14 compostos após 24 horas na concentração de 50 μ M.



Fonte: Arquivo próprio

Pôde-se observar que todas as linhagens demonstraram variações consideráveis na redução da atividade metabólica dos compostos. A linha traçada na horizontal marca o ponto limite de

50% de atividade metabólica para cada célula. Os efeitos das DHPs foram analisados estatisticamente em relação às células do controle (não tratadas) para $p < 0,05$.

A linhagem celular padrão de fibroblasto L929 apresentou proximidade à margem de atividade citotóxica das células quando tratadas com os compostos **(CP)2, 6, 7,10,12, 13 e 14**, observada através da redução da atividade metabólica de $42,5\% \pm 0,79$ (**CP2**), $45,5\% \pm 0,77$ (**CP6**), $41,23\% \pm 0,36$ (**CP7**), $47,21\% \pm 1,5691$ (**CP10**), $43,33\% \pm 0,73$ (**CP12**), $51,7\% \pm 0,65$ (**CP13**) e $46,67\% \pm 0,033$ (**CP14**).

A linhagem de carcinoma de pulmão (A549) não apresentou sensibilidade a nenhum dos compostos (na concentração de $50 \mu\text{M}$). No entanto, se comparada ao controle com doxorrubicina, nota-se que os compostos **12 e 14** foram capazes de reduzir a atividade metabólica das células tratadas em $22,21$ e $21,16\%$, respectivamente, enquanto a doxorrubicina reduziu $26,6\%$ da atividade metabólica.

A linhagem de melanoma humano SKMEL-28 apresentou pouca sensibilidade aos compostos. No entanto, ainda que não tenha reduzido o suficiente para que os DHPs fossem considerados citotóxicos a elas nessa concentração, o comportamento dessa linhagem apresentou redução considerável na atividade metabólica quando tratada com os análogos **(CP) 2, 10, 11, 12, 13 e 14** de $38,27\% \pm 0,91$ (**CP2**), $29,23\% \pm 0,8$ (**CP10**), $30,79\% \pm 0,28$ (**CP11**), $32,12\% \pm 0,53$ (**CP12**), $31,39\% \pm 0,53768$ (**CP13**) e $30,53\% \pm 2,16$ (**CP14**).

A linhagem que apresentou maior sensibilidade aos compostos foi a de glioma murino GL-261. A atividade metabólica foi menor que 50% para os compostos **(CP) 2, 10, 12, 13 e 14**, mostrando redução de $80,24\% \pm 0,73$ (**CP2**), $59,38\% \pm 0,75$ (**CP10**), $57,34\% \pm 0,17$ (**CP12**), $57,71\% \pm 0,64$ (**CP13**) e $58,21\% \pm 0,09$ (**CP14**).

Uma análise diagnóstica das estruturas DHP testadas em relação à sua atividade citotóxica mostra que 4-(para-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina (**CP2**) foi o mais potente, e também o mais seletivo, em relação à sua citotoxicidade, confirmando a afirmação de Pollo et al (2017) que diz que a posição do NO_2 em *para* aumenta a citotoxicidade desse análogo.

No geral, os compostos contendo grupos OH e MeO mostraram aumento de sua atividade citotóxica com a adição da porção N-Ph, com exceção do composto 4-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,4-DHP (**CP11**), que não apresentou variação significativa da sua citotoxicidade para as linhas celulares. O grupo OMe adicional ao **CP4**, produzindo o composto **7**, não o tornou citotóxico. O mesmo ocorreu para sua forma metoxilada (que é o **CP1**) todas as células mostraram uma boa tolerância a ele. A presença de um grupo OMe na posição orto do fenol na estrutura DHP do **CP3** (dando origem ao **CP4**), aumentou um pouco sua toxicidade,

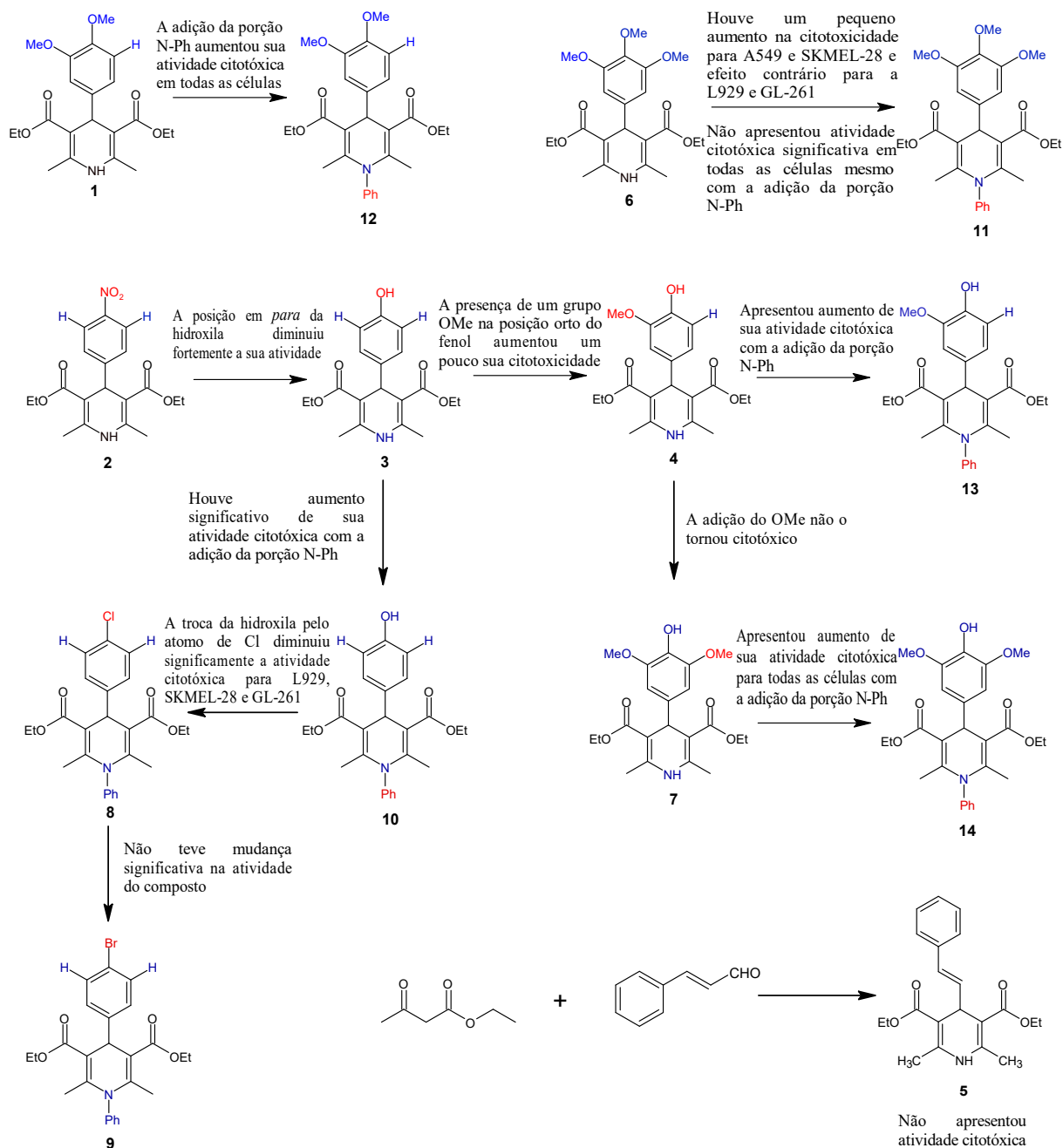
conforme anteriormente mostrado por Pollo et al (2017), no entanto não foi suficiente para reduzir em 50% a atividade metabólica das células tumorais.

A porção N-Ph do composto **10** (derivado do **CP3**), melhorou bastante a atividade citotóxica em comparação com a atividade em **3**, o qual a posição em *parada* hidroxila diminuiu fortemente a sua atividade em comparação com o **CP2**. Já o **CP8** foi menos citotóxico que seu congêneres **CP10**, com o Cl no lugar do OH.

Não teve mudança significativa da atividade do composto **8** em relação ao composto **9** com a troca do átomo do Cl, podendo-se dar ao fato de que a propriedade eletrônica do Cl é semelhante à do Br (POLLO et al, 2017). O Br e Cl possuem eletronegatividades próximas e conseqüentemente o seu efeito indutivo eletroretirador sobre o anel tem uma magnitude similar. Entretanto, outros efeitos, como a orientação da molécula, os efeitos mesoméricos (que são os de menor força), entre outros, podem estar envolvidos no processo.

Na Figura 18 pode-se observar o resumo da atividade citotóxica dos análogos sobre as células. As cores azul e vermelho caracterizam, respectivamente, o que permaneceu ou foi mudado na estrutura dos análogos e sua influência na atividade citotóxica analisada a partir da atividade metabólica das células.

Figura 18 - Resumo dos compostos e suas variações da atividade citotóxica conforme estrutura.

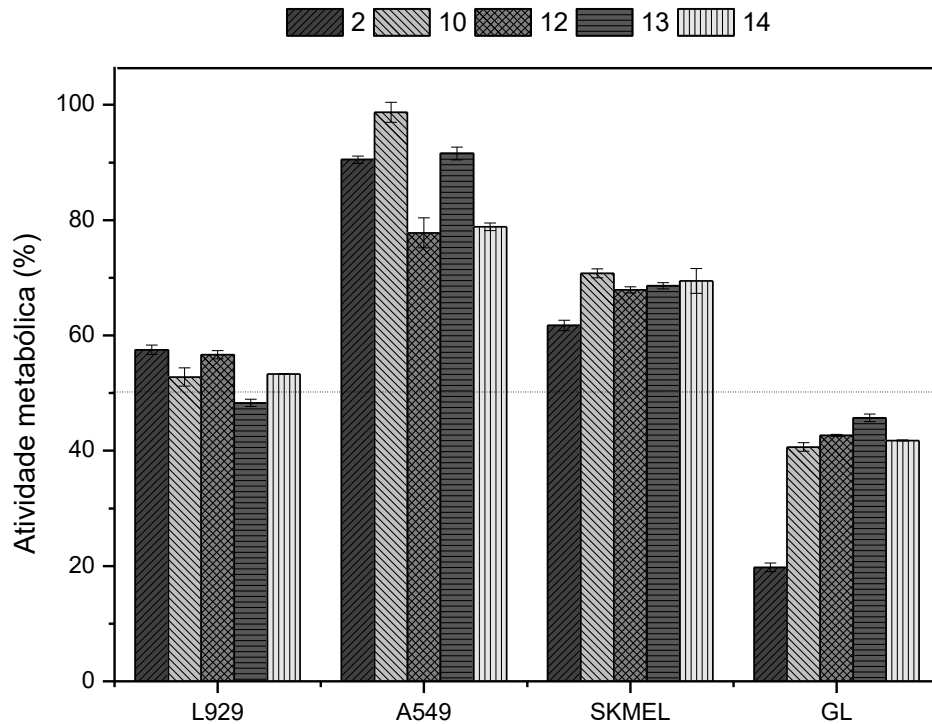


Fonte: Arquivo próprio

Os compostos 2, 10, 12, 13 e 14 foram selecionados para a Etapa 2 (Figura 19) por apresentarem maior influência na sensibilidade das células estudadas com considerável efeito citotóxico sobre a GL-261 e a linhagem de câncer de pulmão A549 foi eliminada por não ter mostrado sensibilidade suficiente, a nenhum desses compostos, para as próximas etapas do estudo. Os compostos apresentaram maior efeito citotóxico na GL-261 com alterações

significativas ($p < 0,05$, relativo ao controle) apresentando uma redução da atividade metabólica em $19,8 \pm 0,7\%$ para o composto 2.

Figura 19- Atividade metabólica da linhagem de L929, A549, SKMEL-28 e GL261 para os compostos 2, 10, 12, 13 e 14, na concentração de $50\mu\text{M}$, selecionadas na triagem.

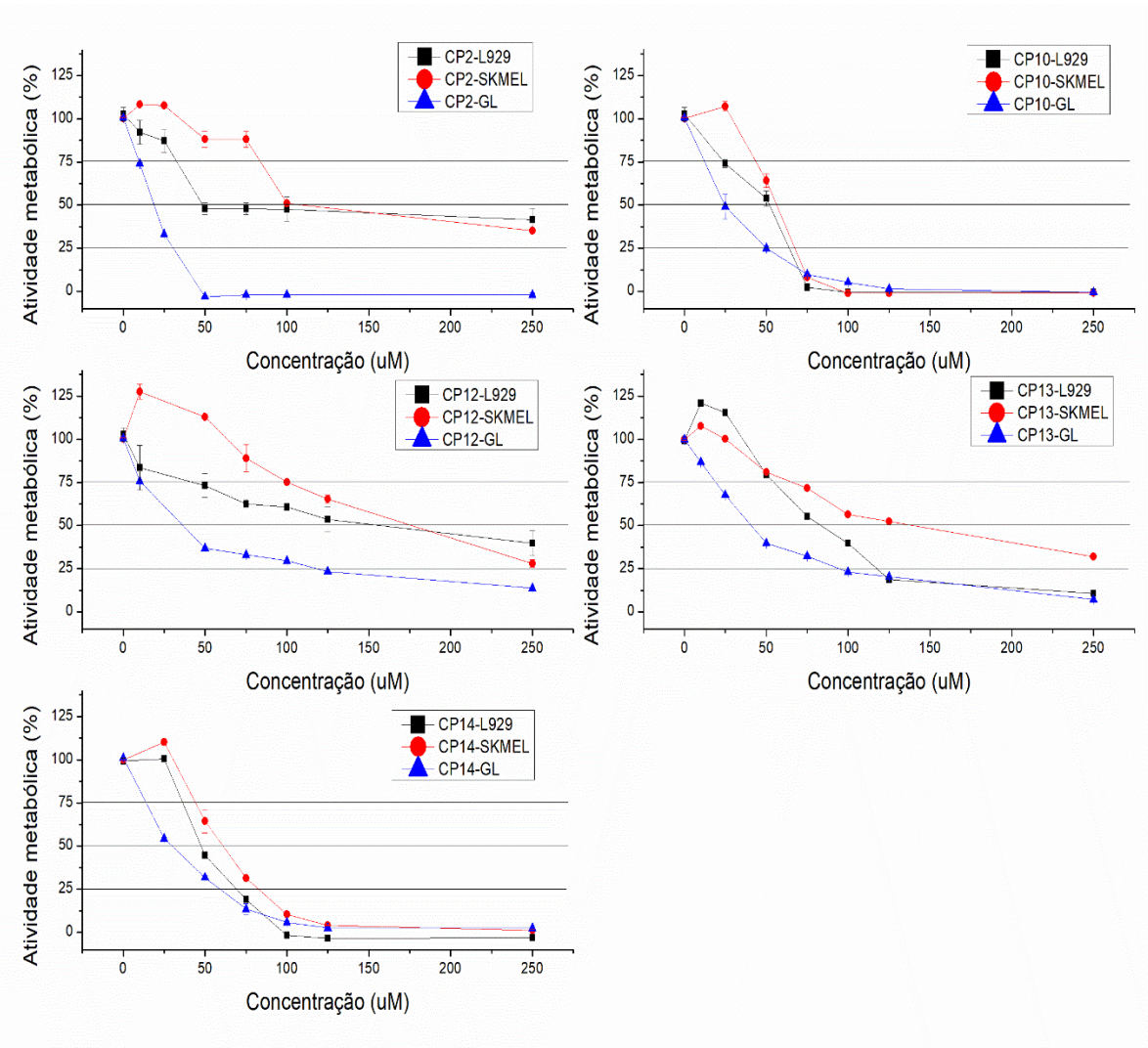


Fonte: Arquivo próprio.

4.2. ETAPA 2 - IDENTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA ABSOLUTA (IC₅₀)

Os compostos que apresentaram maior atividade na redução celular em uma concentração fixa de $50\mu\text{M}$ foram selecionados na etapa anterior. Nesta etapa, a concentração necessária para eliminar 50% da atividade metabólica das células em cultura 2D foi determinada. Para tanto, os diferentes compostos DHPs foram testados sob diferentes concentrações (de 10 a $250\mu\text{M}$) sobre as células de L929, SKMEL-28 e GL261. O resultado está expresso na Figura 20, com as concentrações do IC₅₀ e a redução da atividade metabólica celular em %.

Figura 20- Atividade metabólica de células L929, SKMEL-28 e GL261 após 24 horas de tratamento DHPs (CP2, CP10, CP12, CP13, CP14) com diferentes concentrações. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se 3 replicatas para cada ensaio.



Fonte: Arquivo próprio.

Como pode ser visto na Figura 20, a linhagem GL261 reduziu significativamente a atividade metabólica para todos os compostos já nas concentrações iniciais, enquanto as linhagens de L929 e SKMEL-28 apresentaram algumas variações de comportamento.

Para o CP2, as células L929 apresentaram uma redução da atividade metabólica em 50% sob uma concentração de 48,33 μ M, enquanto que para a GL261 o IC₅₀ foi de apenas 19,14 μ M, mostrando ser um composto seletivo. No entanto, para as células SKMEL-28, o IC₅₀ foi de 100,22 μ M, muito maior que a concentração das células controle. Esse comportamento foi

um tanto semelhante nos CPs 12 e 13, por mostrarem-se seletivos quanto a GL261 com seus respectivos IC₅₀ de 33,86 μ M e 40,46 μ M, enquanto que para a L929, seguindo a mesma ordem dos compostos, os IC₅₀ foram de 157,41 μ M e 83,65 μ M. Contudo, esses mesmos compostos apresentaram uma progressão de citotoxicidade mais fraca em relação a SKMEL-28, com IC₅₀ maior de 119,57 μ M para o CP12 e 138,1 μ M para o CP13, impossibilitando a seletividade.

Os compostos 10 e 14 apresentaram a maior atividade citotóxica, nos quais a maior concentração testada (250 μ M) promoveu a diminuição de células metabolicamente ativas para todas as três linhagens de células. A L929 apresentou IC₅₀ de 51,60 μ M para o CP10 e 47,6 μ M para o CP14. A GL 261 apresentou IC₅₀ de 24,91 μ M e 29,25 μ M, respectivamente, mostrando um composto seletivo em relação a L929. A SKMEL-28 teve IC₅₀ de 56,07 μ M para a CP10 e de 61,25 μ M para o 14, mostrando-se mais resistente que o controle.

A Tabela 1 mostra os valores da concentração em μ M de IC₅₀ de cada composto sobre as células testadas.

Tabela 1 - Concentração em μ M de IC₅₀ para cada composto sobre as células.

| DHPs | Morte celular | L929 | SKMEL-28 | GL261 |
|------|---------------|--------|----------|-------|
| 2 | 50% | 48,33 | 100,22 | 19,14 |
| 10 | 50% | 51,6 | 56,07 | 24,91 |
| 12 | 50% | 157,41 | 119,57 | 33,86 |
| 13 | 50% | 83,65 | 138,1 | 40,46 |
| 14 | 50% | 47,6 | 61,25 | 29,25 |

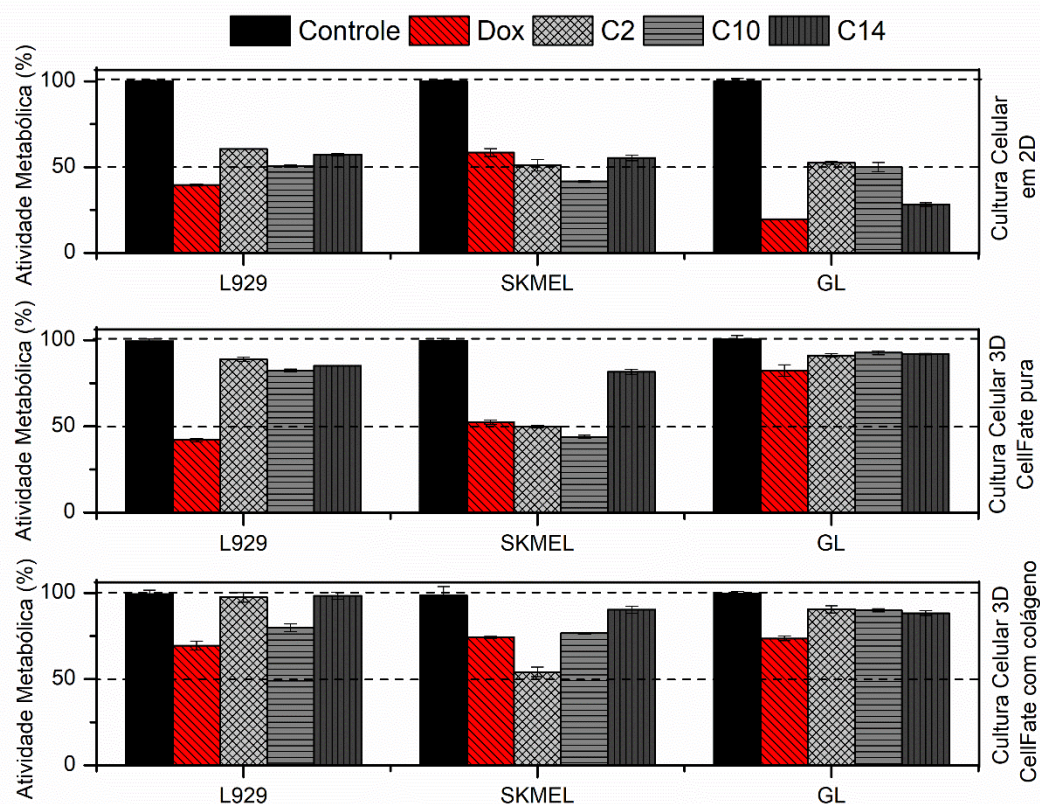
Fonte: Arquivo próprio.

4.3. ETAPA 3 - COMPARAÇÃO DA TRIAGEM EM CULTIVO 2D VS 3D

Nessa etapa foi possível observar o comportamento metabólico e morfológico das células quanto aos dois tipos de matrizes CellFate® em comparação com as células cultivadas em placas. A absorbância do cultivo em 2D em 24 horas foi muito maior que a das células em matrizes 3D cultivadas por três dias sob as mesmas condições. A confluência das células na placa já era em torno de 90% e as células se mostravam bem espalhadas. Já nas membranas foi necessário mais tempo para que elas se desenvolvessem.

Nessa etapa, as concentrações do IC₅₀ de cada tipo celular sob a ação dos respectivos compostos foi administrado sob as mesmas condições e disponibilidade para o cultivo 2D e 3D, apresentando os seguintes resultados expostos na Figura 21.

Figura 21 - Triagem dos compostos em cultivo 3D nas matrizes CellFate® pura e tratada com colágeno nas concentrações do IC50 encontrados em cultivo 2D.



Fonte: Arquivo próprio.

Conforme pode ser observado na Figura 21, as células no cultivo 2D tiveram, sob a concentração do IC50, perda da atividade metabólica próximo, maior ou igual a 50%, confirmando a atividade citotóxica dos compostos nessa condição de cultivo. No entanto, para os cultivos 3D nos dois tipos de CellFate®, as respostas foram diferentes, seguindo um comportamento semelhante entre elas.

Todas as condições de cultivo, tanto em 2D quanto nas duas matrizes 3D, sustentaram a viabilidade e promoveram a proliferação celular refletindo no número de células viáveis à medida que os valores de absorbância crescentes para o ensaio MTS foram sendo obtidos ao longo do tempo de incubação de 24 e 72 horas respectivamente.

Houve diferenças significativas na resposta de proliferação celular para CellFate® pura e CellFate® modificada com colágeno, sendo os níveis de conversão de MTS maiores no caso da matriz CellFate® contendo colágeno ($p < 0,05$). Esse aumento do número de células metabolicamente ativas e viáveis pode ser atribuído ao tratamento com colágeno tipo I, que é a

forma mais abundante presente no corpo humano (GLOWACKI; MIZUNO, 2008; PATHAK; KUMAR, 2011; ORGEL et al., 2014).

O tratamento da membrana com colágeno facilitou a fixação das células por meio de receptores, possivelmente integrina, já nas 4 primeiras horas após sua semeadura sobre o material, o que pode ser justificado pela possível ativação das vias de sinalização celular (YANG et al., 2004; KUTSCHKA et al., 2006), que controlam a sobrevivência, o crescimento e a diferenciação celular. Esse fato explicaria o comportamento das células em já estarem começando espalhar sobre a CellFate® tratada, não apresentando o mesmo comportamento sobre a CellFate® pura.

A CellFate® pura também demonstrou proliferação, diferenciação e adesão celular adequadas para o cultivo (BRACKMANN, C. et al., 2010; FINK, H. et al., 2010; ZABOROWSKA, M. et al., 2010), seguindo o mesmo padrão metabólico das células em CellFate® com tratamento, apenas em menor absorvância e mais independentes depois dos 3 dias de cultivo, em contraste àquela que as células se apresentaram agregadas em aglomerados com maior densidade celular.

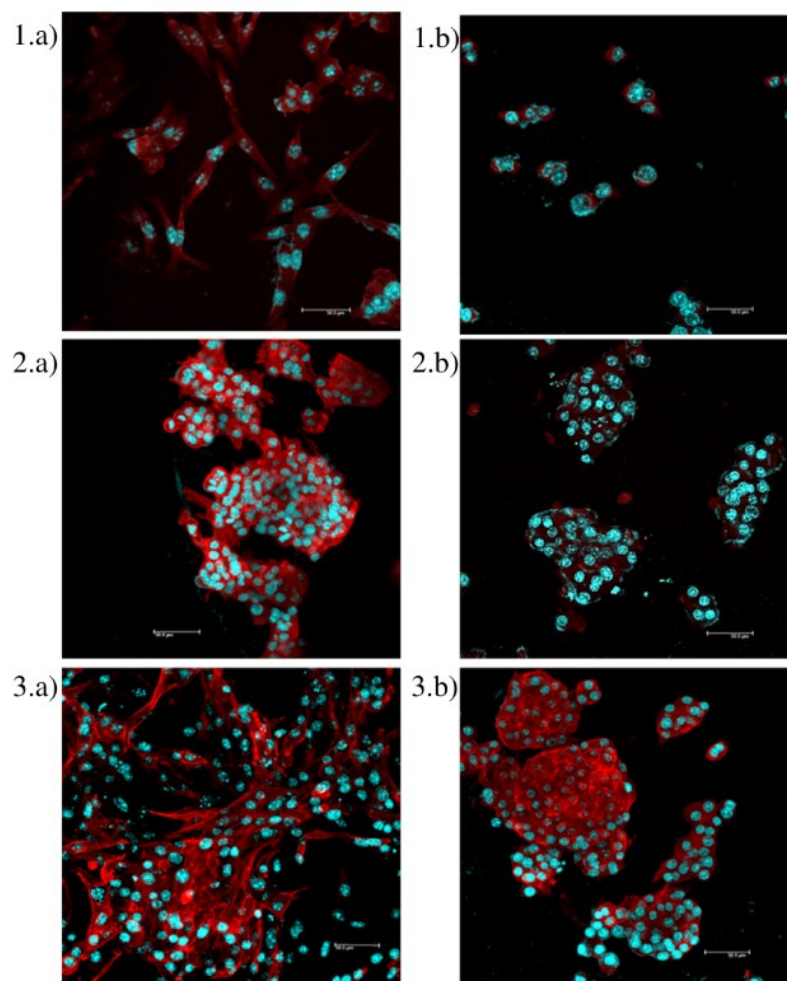
Nos estudos *in vitro*, a adesão, viabilidade e morfologia das células cancerígenas durante e após 3 dias de cultura nos dois tipos de matrizes CellFate® foram observados. A Figura 22 mostra a comparação das células cultivadas em ambas as membranas indicando que após esse tempo, um número maior de estruturas de fixação das células, especialmente a SKMEL-28, são apresentadas sobre a matriz tratada com colágeno (Figura 22 - 3.a) em relação às células cultivadas sobre a matriz pura (Figura 22 - 2.a).

É interessante observar que as células que exibiam sua morfologia característica de uma forma aproximadamente arredondada tendiam a se prender e crescer ao longo das estruturas. Este fenômeno foi mais evidente na CellFate® com colágeno do que na pura. Este crescimento celular foi semelhante ao encontrado em células semeadas em estruturas de alginato de quitosana e celulose/gelatina (KIEVIT, F.M., et al., 2010; WANG, J., et al., 2018). As células agruparam-se formando agregados celulares ligados aos andaimes, sendo possível notar as interações célula-célula e célula-matriz extracelular que existem no corpo. De acordo com Szotet al. (2011), na cultura *in vitro*, devido à microestrutura e às limitações de componentes dos *scaffolds* cultivados, os aglomerados de células formados e, em várias camadas, são difíceis de encontrar durante a cultura de curto tempo. Logo, estes resultados sugerem que essas matrizes têm o potencial de dar um suporte mais preciso ao desenvolvimento das células, em especial a CellFate® com colágeno que proporciona a redução da quantidade

de tempo necessária para maturação celular para proceder com os experimentos, reduzindo os custos significativos e a perda de vida animal associada aos modelos *in vivo*.

Figura 22- Análise morfológica de autofluorescência por MCVL em culturas de SKMEL-28

1.a) 2D controle, 1.b) 2D com atividade do CP14 na concentração do IC50; 2.a) CellFate® pura - controle, 2.b) CellFate® pura - com atividade do CP14 na concentração do IC50; e 3.a) CellFate® com colágeno - controle, 3.b) CellFate® com colágeno - com atividade do CP14 na concentração do IC50.



Fonte: Arquivo próprio.

A Figura 22-1.a mostra o comportamento morfológico da célula com o núcleo (em azul) mais individualizado e citoesqueleto (em vermelho) mais espalhado sobre a placa, sendo que, após o tratamento (Figura 22 - 1.b), esse citoesqueleto é reduzido consideravelmente juntamente com a quantidade de núcleos ainda viáveis. No sistema 3D, a avaliação dos compostos foi melhorada, conforme afirmou Horning et al (2008), fornecendo um estudo mais fiel ao comportamento dinâmico e progressivo das células sob condições controladas. Foi

possível avaliar o desempenho das três linhagens celulares cultivadas nas três diferentes condições de cultura em relação ao seu comportamento quanto a adesão, proliferação e morfologia celular antes (Figura 22- 2.a e 3.a) e depois da adição dos compostos (Figura 22 - 2.b e 3.b). Nos cultivos em 3D, após a adição dos compostos, os agregados celulares permaneceram, reduzindo as conexões entre si nas duas matrizes (CellFate® pura e CellFate® com colágeno).

Corroborado por Wang et al (2018) as condições de cultivo tridimensional *in vitro* mostram uma resposta mais realista aos medicamentos. Nesse estudo houve, na sua maioria, a redução da atividade citotóxica dos análogos de DHP, mostrando que, concentrações mais altas desses compostos são necessárias para atingir uma redução comparável na atividade metabólica celular e potencial invasivo em culturas de células 3D em relação às culturas 2D (TALUKDAR, S.; KUNDU, 2012). Geralmente os tumores se mostram mais rígidos do que o tecido saudável circundante, o que pode contribuir na resistência aos medicamentos (HOLLE et al., 2016; BORDELEAU et al., 2017; LIN et al., 2017). O hidrogel também serve como uma barreira de difusão para nanopartículas, como mostrou Xu et al. (2014) em que as células cultivadas em 3D foram mais resistentes ao tratamento com docetaxel em relação ao 2D. As interações entre as células e a matriz também podem levar a uma resposta heterogênea ao composto, com as células externas ligadas à matriz sendo resistentes ao fármaco e as células no núcleo do tumor sendo sensíveis (MURANEN et al., 2012). Esse comportamento é esperado, conforme mostrado por diversas pesquisas com diferentes linhagens celulares (DUNNE, L.W. et al., 2014; KUNDU, B. et al, 2013; XU, Z. et al, 2013; LEE, J. M. et al, 2013; YANG, Z.; ZHAO, X., 2011; FITZGERALD, K. A. et al, 2015; LV, D. et al, 2016; FONG, E. L. et al, 2013)

No entanto o **CP2** teve atividade citotóxica similar em todos os ambientes, tanto 2D quanto 3D nas duas matrizes, sob a concentração do IC50 para as células de SKMEL-28, mostrando potencial antitumoral para melanoma humano. Das et al (2012) identificaram que melanócitos normais e células de melanoma expressam canais de Ca_v1 ; mas também canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (EAG1 e IK) (SCHÖNHERR, R. 2005). Portanto, nesse caso, o DHP também pode ter se comportado como ligante de receptores acoplados a proteína G (GPCR) atuando como antagonista do α_{1A} adrenoreceptor, uma vez que os derivados mais interessantes da (S) - (+) - nifedipina, antagonista seletivo para o receptor adrenérgico α_{1A} com alta afinidade para canais de Ca^{2+} do tipo L, carregam um anel p-NO₂-4-fenil em C-4 e grupos amida nas posições C-3 e C-5, diferentemente substituídos, levando a uma similaridade com a estrutura do **CP2** (IOAN, P. et al, 2011; CATTERALL et al, 2021). O que pode ter interferido

na homeostase celular do cálcio impossibilitando a proliferação das células em todas as três condições impostas.

O glioma murino (GL261) foi a linhagem celular de maior sensibilidade aos compostos em ambiente 2D, porém em ambiente 3D ele se mostrou resistente e com variações pouco relevantes entre a matriz pura e a tratada com colágeno. Em um estudo anterior com agentes alquilantes, os gliomas também demonstraram resistência aumentada, com uma proporção muito maior de células-tronco (LV, D. et al, 2016). Isso pode se dar ao fato da MEC do cérebro ser caracterizada por possuir uma abundância relativa baixa de proteínas da matriz e uma alta prevalência de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas, alguns dos quais são específicos do cérebro, levando assim a interações célula-MEC que não são apenas mediadas por integrinas, mas também por uma variedade de receptores específicos de tecido predominantemente encontrados em neurônios e células gliais (BARROS et al., 2011) facilitando sua adaptação aos *scaffolds*.

Também devido as condições de cultivos 3D aqui realizadas, é provável que os canais iônicos das células reagiram de uma forma mais similar a real, uma vez que estudos pré-clínicos com gliomas (NICOLETTI, N. F. et al, 2017) têm respondido de forma positiva aos bloqueadores de canais de cálcio do tipo P/Q e N encontrados em neurônios, enquanto que os DHPs são bloqueadores dos canais tipo L.

Em comparação com as culturas *in vitro* 2D, todos esses resultados mostraram que as condições de cultivo sobre as membranas CellFate® têm um efeito positivo na adesão e disseminação celular, mostrando um caminho de apoio forte à adesão celular, colonização, disseminação, proliferação e diferenciação, apresentando propriedades fisiológicas mais semelhantes às *in vivo*, podendo auxiliar nos novos horizontes que os estudos pré-clínicos da triagem de fármacos estão seguindo.

Há a necessidade de mais estudos focados nos efeitos específicos do ciclo celular dos canais iônicos e suas funções homeostáticas em células cancerígenas nas condições experimentais que se aproximem da situação *in vivo*, juntamente com a necessidade de validação *in vitro* das modelagens de homologia de canais de cálcio tipo L para compreender a ação e mecanismos de 1,4-DHPs voltado ao câncer e este estudo abre as portas para tais testes. Dá suporte as pesquisas *in vitro* que buscam mimetizar microambientes tumorais com as especificidades da membrana extracelular nativa, manipulando os parâmetros de cultivo como baixa pressão de oxigênio, acidose e exposição às proteínas séricas para direcionar as

propriedades seletivas de 1,4-DHP nas interações com os canais iônicos e receptores acoplados à proteína G (GPCRs).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi avaliada a atividade citotóxica de compostos análogos de DHP que apresentaram atividade antitumoral em modelo de cultura celular 2D e comparada com a atividade antitumoral apresentada em cultivo celular sobre dois tipos de plataformas tridimensionais CellFate®.

Devido aos diferentes grupamentos funcionais e as diferentes linhagens celulares, resultados distintos foram obtidos. Na Etapa 1, a triagem em 2D apresentou maior citotoxicidade, no geral, para os compostos contendo grupos OH e MeO com a adição da porção N-Ph. Sendo o **CP2** de maior atividade citotóxica devido a posição do NO₂ em *para* e único a apresentar atividade antitumoral nos três ambientes para a linhagem celular SKMEL-28 sendo seletivas para as saudáveis de L929. Sendo assim, os 5 compostos selecionados nessa Etapa, por mostrarem redução desejada, apresentaram alguma dessas particularidades citadas. No entanto, a A549 apresentou resistência a todos na concentração usada (50 µM).

Na Etapa 2, com o conhecimento do IC₅₀ (medida quantitativa de uma determinada substância que é necessária para inibir um processo biológico pela metade, tendo como referência o controle), foi possível selecionar os compostos conforme redução da atividade celular específica de cada célula, apontando os melhores resultados com as menores concentrações para o CP2 contendo NO₂ na posição *para*, CP10 contendo uma hidroxila e adição da porção N-Ph e CP14 com OH, metoxilado e adição da porção N-Ph.

A Etapa 3 possibilitou a análise comportamental das células em cultivo 2D e em cultivo 3D sob o efeito dos compostos selecionados, sendo o cultivo 3D feito sobre dois tipos de matrizes comerciais CellFate®, pura e tratada com colágeno. Nessa etapa verificou-se que a morfologia celular em cultivo 3D se diferenciou muito da morfologia celular em cultivo 2D. As células em 3D formaram agregados celulares, tornando-as assim mais resistentes ao tratamento com compostos. Na matriz CellFate® tratada com colágeno, esses agregados possuíam mais ramificações que conectavam as células e os grupos de células entre si, mostrando-se metabolicamente mais ativos do que as células da CellFate® sem tratamento, que também apresentaram aspectos semelhantes, no entanto em proporções reduzidas.

No geral, os compostos selecionados em 2D tiveram sua atividade citotóxica reduzida quando testados em 3D. A matriz CellFate® com tratamento, em comparação com a matriz CellFate® pura, possibilitou maior atividade metabólica para a L929 e SKMEL-28, no entanto,

a GL-261 apresentou pouca variação entre as matrizes, mostrando-se muito mais resistente aos compostos, uma vez que vinha apresentando maior sensibilidade aos mesmos nos testes em 2D.

Portanto, este estudo sugere que as condições de cultivo celular para triagem de fármacos alteram notavelmente a susceptibilidade dos compostos para as células, tanto saudáveis quanto as cancerígenas. Por esse motivo, as estratégias de medicamentos modernos tiram vantagem de direcionar as interações entre as células tumorais e os fatores microambientais promotores de tumores. Tal abordagem requer modelos de câncer que imitem mais fielmente o microambiente de um tumor e tornem a descoberta de drogas contra o câncer a aplicação de crescimento mais rápido para culturas de células 3D. As plataformas tridimensionais utilizadas neste estudo mostraram-se tecnologias promissoras para auxiliar no desafio de desenvolvimento de modelos de doenças *in vitro* mais realistas para a descoberta de drogas.

REFERÊNCIAS

- ALTUN, E.; Aydogdu, M.O.; Togay, S.O.; Sengil, A.Z.; Ekren, N.; Haskoylu, M.E.; Oner, E.T.; Altuncu, N.A.; Ozturk, G.; Crabbe-Mann, M.; Ahmed, J.; Gunduz, O.; Edirisinghe M.. Bioinspired scaffold induced regeneration of neural tissue *Eur. Polym. J.*, 114 (2019) (2019), pp. 98-108.
- ANDRADE, F. K.; Pertile, R. A. N.; Dourado, F.; Gama F. M. Bacterial Cellulose: Properties, Production and Applications. In: LEJEUNE, A.; DEPREZ, T. (Eds.). *Cellulose: structure and properties, derivatives and industrial uses*. New York: Nova Science Publishers, 2010. p. 427-458.
- ANTON, Delphine *et al.* Three-dimensional cell culture: A breakthrough *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 2015.
- ANTONI, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5517–5527. doi: 10.3390/ijms16035517.
- ARROWSMITH, J., Miller, P. Fase II e taxas de atrito da Fase III 2011–2012. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 569 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrd4090>.
- ATILA, D., Karataş, A., Evcin, A. *et al.* Bacterial cellulose-reinforced boron-doped hydroxyapatite/gelatin scaffolds for bone tissue engineering. *Cellulose* **26**, 9765–9785 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02741-1>
- BAKER, Brendon M.; CHEN, Christopher S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, v. 125, n. 13, p. 3015–3024, 2012.
- BARROS, Andreia S. *et al.* Comparative study of the therapeutic effect of Doxorubicin and Resveratrol combination on 2D and 3D (spheroids) cell culture models. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 551, n. 1–2, p. 76–83, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.016>>.
- BAUMERT C., Günthel M., Krawczyk S., Hemmer M., Wersig T., Langner A., Molnár J., Lage H., Hilgeroth A. Development of small-molecule P-gp inhibitors of the N-benzyl 1, 4-dihydropyridine type: Novel aspects in SAR and bioanalytical evaluation of multidrug resistance (MDR) reversal properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21** (1) (2013), pp. 166-177
- BIOCELLTIS. **Linha CellFate** ®, c2020. Página inicial. Disponível em: <<https://www.educamaisbrasil.com.br/educacao/>>. Acesso em: 09 de nov. de 2020.
- BONNIER, F., Keating M.E., Wróbel T.P., Majzner K., Baranska M., Garcia-Munoz A., Blanco A., Byrne H.J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol. Vitro.* 2015;29:124–131.
- BOSSERT, F., Valter, W. 1,4-Dihydropyridines - a basis for developing new drugs. *Med Rev Rev*, 1989; 9 (3):291-324. doi: 10.1002/med.2610090304.
- BRACKMANN C., Bodin A., Keson M., Gatenholm P., Enejder A. Visualization of the cellulose biosynthesis and cell integration into cellulose scaffolds. *Biomacromolecules*. 2010;11:542–548. doi: 10.1021/bm901153t.
- BRIEDE J, Stivrina M, Vigante B, Stoldere D, Duburs G. Acute effect of antidiabetic 1,4-dihydropyridine compound cerebrocrast on cardiac function and glucose metabolism in the isolated, perfused normal rat heart. *Cell Biochem Funct.* 2008 Mar-Apr;26(2):238-45. doi: 10.1002/cbf.1442. PMID: 17990288.
- CACICEDO ML, Castro MC, Servetas I, Bosnea L, Boura K, Tsafraquidou P, Dima A, Terpou A, Koutinas A, Castro GR. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresour Technol.* 2016 Aug;213:172-180. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.071. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26927233.

- CAKMAK, A.M.; Unal, S.; Sahin, A.; Otkar, F.N.; Sengor, M.; Ekren, N.; Gunduz, O.; Kalaskar, D.M. 3D Printed Polycaprolactone/Gelatin/Bacterial Cellulose/Hydroxyapatite Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Polymers* 2020, *12*, 1962. <https://doi.org/10.3390/polym12091962>
- CANDINI, Olivia *et al.* A Novel 3D In Vitro Platform for Pre-Clinical Investigations in Drug Testing, Gene Therapy, and Immuno-oncology. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Aug 1;3(8):a003947. doi: 10.1101/cshperspect.a003947. PMID: 21746798; PMCID: PMC3140680.
- CATTERALL, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch T.P., Striessnig, J., (2021). Voltage-gated calcium channels (Cav) (version 2021.2) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE, 2021(2)*. Disponível em: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F80/2021.2>.
- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS- CGEE. Competências para inovar na indústria farmacêutica brasileira. Brasília, DF: 2017. 126p
- CESCA, K., Rufino, I., Godinho, J., Porto, L. M. Membranas De Celulose Bacteriana E Aloe Vera Como Sistema De Entrega De Agentes Terapêuticos. *Processos Biotecnológicos. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis. SC. 2014.*
- CHEN X, Zhang YS, Zhang X, Liu C. Organ-on-a-chip platforms for accelerating the evaluation of nanomedicine. *Bioact Mater.* 2020 Oct 12;6(4):1012-1027. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.09.022. PMID: 33102943; PMCID: PMC7566214.
- CHWALEK, Karolina *et al.* Glycosaminoglycan-based hydrogels to modulate heterocellular communication in in vitro angiogenesis models. *Scientific Reports*, v. 4, p. 4–11, 2014.
- COBURGER C., Wollmann J., Krug M., Baumert C., Seifert M., Molnár J., Lage H., Hilgeroth A.; Novel structure–activity relationships and selectivity profiling of cage dimeric 1, 4-dihydropyridines as multidrug resistance (MDR) modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18 (14) (2010), pp. 4983-4990
- COLLA, G., Porto, L.M. Development of artificial blood vessels through tissue engineering. *BMC Proc* **8**, P45 (2014). <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-P45>
- COMINACINI L, Fratta Pasini A, Garbin U, Pastorino AM, Davoli A, Nava C, Campagnola M, Rossato P, Lo Cascio V. Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Mar 21;302(4):679-84. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00158-x. PMID: 12646222.
- COSTA, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., and Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 1427–1441. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
- COURTENAY, J.C.; Sharma, R.I.; Scott, J.L. Recent Advances in Modified Cellulose for Tissue Culture Applications. *Molecules* 2018, *23*, 654. <https://doi.org/10.3390/molecules23030654>
- CURVELLO R, Raghuwanshi VS, Garnier G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019 May;267:47-61. doi: 10.1016/j.cis.2019.03.002. Epub 2019 Mar 8. PMID: 30884359.
- DAS, A., Pushparaj, C., Bahí, N., Sorolla, A., Herreros, J., Pamplona, R., et al. (2012). Functional Expression of Voltage-Gated Calcium Channels in Human Melanoma. *Pigment Cel Melanoma Res* 25 (2), 200–212. doi:10.1111/j.1755-148X.2012.00978.x10.1111/j.1755-148x.2012.00978.x.
- DHALIWAL, A. (2012). Three dimensional cell culture: a review. *Mater. Methods* 2:162. doi: 10.13070/mm.en.2.162

- DHIMAN, Harpreet K.; RAY, Alok R.; PANDA, Amulya K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials*, v. 26, n. 9, p. 979–986, 2005.
- DOCAMPO, A.E. Vercesi, G. Huang. Mitochondrial calcium transport in trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 196 (2014), pp. 108-116
- DUNNE LW, Huang Z, Meng W, Fan X, Zhang N, Zhang Q and An Z: Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments. *Biomaterials*. 35:4940–4949. 2014.
- DUVAL K., Grover H., Han L.H., Mou Y., Pegoraro A.F., Fredberg J., Chen Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;**32**:266–277.
- EDRAKI N., Mehdipour AR, Khoshneviszadeh M., Miri R, Dihydropyridines: evaluation of their current and future pharmacological applications, *Drug Discovery Today*, Volume 14, Issues 21–22, 2009, Pages 1058-1066, ISSN 1359-6446, doi.org/10.1016/j.drudis.2009.08.004.
- EISSA A.A., Farag N.A., Soliman G.A. Synthesis, biological evaluation and docking studies of novel benzopyranone congeners for their expected activity as anti-inflammatory, analgesic and antipyretic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (14) (2009), pp. 5059-5070.
- EL-SHERBINY, Ibrahim M.; YACOUB, Magdi H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice*, v. 2013, n. 3, p. 38, 2013. Disponível em: <<http://www.qscience.com/doi/abs/10.5339/gcsp.2013.38>>.
- EMRE Oz Y, Keskin-Erdogan Z, Safa N, Esin Hames Tuna E. A review of functionalised bacterial cellulose for targeted biomedical fields. *J Biomater Appl*. 2021 Mar 5:885328221998033. doi: 10.1177/0885328221998033. Epub ahead of print. PMID: 33673762.
- EUCLEA, De *et al.* ambiente 2D e 3D . 2015.
- FANG Y., Eglen R.M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*. 2017;**22**:456–472.
- FEI, Yang; GAO, Kun; LI, Wei qin. Artificial neural network algorithm model as powerful tool to predict acute lung injury following to severe acute pancreatitis. *Pancreatology*, v. 18, n. 8, p. 892–899, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.09.007>>.
- FENNEMA E., Rivron N., Rouwkema J., van Blitterswijk C., de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol*. 2013;**31**:108–115.
- FENG, H, Ge, F, Du, L, Zhang, Z, Liu, D. MiR-34b-3p represses cell proliferation, cell cycle progression and cell apoptosis in non-small-cell lung cancer (NSCLC) by targeting CDK4. *J Cell Mol Med*. 2019; 23: 5282– 5291. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14404>
- FENG MY, Rao R. New insights into store-independent Ca²⁺ entry: secretory pathway calcium ATPase 2 in normal physiology and cancer. *Int J Oral Sci*. 2013 Jun;**5**(2):71-4. doi: 10.1038/ijos.2013.23. Epub 2013 May 10. PMID: 23670239; PMCID: PMC3707068.
- FERRICK, D. A., Neilson, A., and Beeson, C. (2008). Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov. Today* 13, 268–274. doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.008
- FIERZ F.C., Beckmann F., Huser M., Irsen S.H., Leukers B., Witte F., Degistirici Ö., Andronache A., Thie M., Müller B. The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2008;**29**:3799–3806.
- FINK H., Faxalv L., Molnar G.F., Drotz K., Risberg B., Lindahl T.L., Sellborn A. Real-time measurements of coagulation on bacterial cellulose and conventional vascular graft materials. *Acta Biomater*. 2010;**6**:1125–1130. doi: 10.1016/j.actbio.2009.09.019
- FITZGERALD KA, Guo J, Tierney EG, Curtin CM, Malhotra M, Darcy R, O'Brien FJ and O'Driscoll CM: The use of collagen-based scaffolds to simulate prostate cancer bone metastases

- with potential for evaluating delivery of nanoparticulate gene therapeutics. *Biomaterials*. 66:53–66. 2015.
- FONG EL, Lamhamedi-Cherradi SE, Burdett E, Ramamoorthy V, Lazar AJ, Kasper FK, Farach-Carson MC, Vishwamitra D, Demicco EG, Menegaz BA, et al: Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:pp. 6500–6505. 2013
- GAUVIN R., Chen Y.-C., Lee J.W., Soman P., Zorlutuna P., Nichol J.W., Bae H., Chen S., Khademhosseini A. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials*. 2012;33:3824–3834.
- GLOBOCAN - Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer (IARC). World Health Organization. GLOBOCAN 2020: Cancer today. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acessado em 23 abril 2021.
- GLOWACKI J., Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*. 2008 May;89(5):338-44. doi: 10.1002/bip.20871. PMID: 17941007.
- GONÇALVES-PIMENTEL, C., Moreno, G. M. M., Trindade, B. S, Isaac A. R., Rodrigues, C. G., Savariradjane, M., Albuquerque, A. V., Aguiar, J. L. A., & Andrade-da-Costa, B. L. S. (2018) Cellulose exopolysaccharide from sugarcane molasses as a suitable substrate for 2D and 3D neuron and astrocyte primary cultures. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 29(9), 139.
- HAISLER, W. L., Timm, D. M., Gage, J. A., Tseng, H., Killian, T. C., and Souza, G. R. (2015). Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat. Protoc.* 8, 1940–1949. doi: 10.1038/nprot.2013.125.
- HALIB N, Ahmad I, Grassi M, Grassi G. The remarkable three-dimensional network structure of bacterial cellulose for tissue engineering applications. *Int J Pharm.* 2019 Jul 20;566:631-640. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.06.017. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31195074.
- HANTZSCH, AR. Ueber die synthese pyridinartiger verbindungen aus acetessigather und aldehydammoniak. *Justus Liebigs Ann Chem.* 1882; 215 (1): 1-82. doi: 10.1002/jlac.188221150102.
- HARAGUCHI Y., Shimizu T., Sasagawa T., Sekine H., Sakaguchi K., Kikuchi T., Sekine W., Sekiya S., Yamato M., Umezu M., Okano T. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. *Nat. Protoc.* 2012;7:850–858.
- HARDING A. More compounds failing Phase I. *The Scientist* 13 de setembro de 2004; disponível em <<https://www.the-scientist.com/news-analysis/more-compounds-failing-phase-i-49707>>(último acesso em 19 de março de 2021).
- HERREROS-POMARES A, Zhou X, Calabuig-Fariñas S, Lee S, Torres S, Esworthy T, Hann SY, Jantus-Lewintre E, Camps C, Zhang LG. 3D printing novel in vitro cancer cell culture model systems for lung cancer stem cell study. *Materials Science & engineering. C, Materials for Biological Applications*. Mar;122:111914. DOI: 10.1016/j.msec.2021.111914. PMID: 33641907.
- HUANG Y., Zhu C., Yang J., Nie Y., Chen C., Sun D.; Recent advances in bacterial cellulose *Cellulose*, 21 (2014), pp. 1-30.
- HUGHES CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*. 2010 May;10(9):1886-90. doi: 10.1002/pmic.200900758. PMID: 20162561.
- HUGHES C., Radan L., Chang W.Y., Stanford W.L., Betts D.H., Postovit L., Lajoie G.A. Mass Spectrometry-Based Proteomics Analysis of the Matrix Microenvironment in Pluripotent Stem Cell Culture. *Molecular & Cellular Proteomics*, p. mcp.M112.020057, 2012.
- HULUBEI V., Meikrantz S.B., Quincy D.A., Houle T., McKenna J.I., Rogers M.E., Steiger S., Natale N. 4-Isoxazolyl-1, 4-dihydropyridines exhibit binding at the multidrug-resistance transporter. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20 (22) (2012), pp. 6613-6620.

HUTCHENS, S. A.; Benson, R. S.; Evans, B. R.; O'Neill, H. M.; Rawn, C. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials*. v. 27, p. 4661-4670, 2006.

IARC - International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. IARC: About Cancer. (Lyon). Disponível em <<https://www-dep.iarc.fr/>>. Acessado em 11 mar. 2021.

IMAMURA Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.* 2015;**33**:1837–1843.

INCA - Instituto Nacional Do Câncer. Câncer. (Brasil): Instituto Nacional do Câncer, 2020. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/>>. Acessado em 18 maio 2021.

INGOLE, V.H.; Vuherer, T.; Maver, U.; Vinchurkar, A.; Ghule, A.V.; Kokol, V. Mechanical Properties and Cytotoxicity of Differently Structured Nanocellulose-hydroxyapatite Based Composites for Bone Regeneration Application. *Nanomaterials* 2020, *10*, 25. <https://doi.org/10.3390/nano10010025>

INSTITUTO ONCOGUIA. Câncer (Brasil): Instituto OncoGuia: O Portal do Paciente com Câncer. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>. Acessado em 18 maio 2021.

INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURERS & ASSOCIATIONS – IFPMA. The Pharmaceutical industry and global health - facts and figures 2015. Disponível em: <https://www.ifpma.org/resource-centre/the-pharmaceutical-industry-and-global-health/>

IOAN P, Carosati E, Micucci M, Cruciani G, Broccatelli F, Zhorov BS, Chiarini A, Budriesi R. 1,4-Dihydropyridine scaffold in medicinal chemistry, the story so far and perspectives (part 1): action in ion channels and GPCRs. *Curr Med Chem.* 2011;**18**(32):4901-22. doi: 10.2174/092986711797535173. PMID: 22050742.

JENSEN C, Teng Y (2020) Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol 7; 2020, pag. 33, DOI=10.3389/fmolb.2020.00033

JIA H., Jia Y., Wang J., Hu Y., Zhang Y., Jia S., "Potentiality of Bacterial Cellulose as the Scaffold of Tissue Engineering of Cornea," *2009 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, 2009, pp. 1-5, doi: 10.1109/BMEI.2009.5305657.

KAMANGAR F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* 2006 May 10;**24**(14):2137-50. doi: 10.1200/JCO.2005.05.2308. PMID: 16682732.

KAPALCZYŃSKA, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., et al. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci.* 14, 910–919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743

KIEVIT FM, Florczyk SJ, Leung MC, Veiseh O, Park JO, Disis ML, Zhang M. Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. *Biomaterials.* 2010 Aug;**31**(22):5903-10. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.062. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20417555; PMCID: PMC2883048.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*, v. 15, n. 5 SPEC. ISS., p. 378–386, 2005.

KLEMM, Dieter *et al.* Bacterial synthesized cellulose Đ arti ® cial blood vessels for microsurgery. v. 26, 2001.

KOLENDA T., Kapalczyńska M., Przybyła W., Zajączkowska M., Teresiak A., Filas V., Ibbs M., Bliźniak R., Łuczewski Ł., Lamperska K. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci.* 2016;**14**:910–919.

- KUNDU B, Saha P, Datta K and Kundu SC: A silk fibroin based hepatocarcinoma model and the assessment of the drug response in hyaluronan-binding protein 1 overexpressed HepG2 cells. *Biomaterials*. 34:9462–9474. 2013
- KUTSCHKA I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, Hendry SL, Pearl J, Hoyt G, Sista R, Yang PC, Blau HM, Gambhir SS, Robbins RC. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I167-73. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001297. PMID: 16820568.
- KUNZELMANN, K. Ion Channels and Cancer. *J Membrane Biol* 205, 159 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0781-4>
- LANG, L., Shay, C., Zhao, X., Xiong, Y., Wang, X., and Teng, Y. (2019). Simultaneously inactivating Src and AKT by saracatinib/capivasertib co-delivery nanoparticles to improve the efficacy of anti-Src therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Hematol. Oncol.* 12:132. doi: 10.1186/s13045-019-0827-1
- LANGHANS, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* 9:6. doi: 10.3389/fphar.2018.00006
- LEEG, Y., Kenny P. A., Lee E. H., and Bissell M. J., “Threedimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells.,” *Nat. Methods*, vol. 4, no. 4, pp. 359–365, 2007.
- LEE JM, Mhaweche-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA and Lawrenson K: A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest*. 93:528–542. 2013.
- LI JJ. Name Reaction.; 2006. doi:10.1007/978-3-642-010553-8.
- LI S, Nih LR, Bachman H, Fei P, Li Y, Nam E, Dimatteo R, Carmichael ST, Barker TH & Segura, T (2017) Hydrogels with precisely controlled integrin activation dictate vascular patterning and permeability. *Nat Mater*. 16(9):953-961.
- LUZ EPCG, das Chagas BS, de Almeida NT, de Fátima Borges M, Andrade FK, Muniz CR, Castro-Silva II, Teixeira EH, Popat K, de Freitas Rosa M, Vieira RS. Resorbable bacterial cellulose membranes with strontium release for guided bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020 Nov;116:111175. doi: 10.1016/j.msec.2020.111175. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32806235.
- LV, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., and Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: a powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol. Lett.* 14, 6999–7010. doi: 10.3892/ol.2017.7134
- LV, D., Yu SC, Ping YF, Wu H, Zhao X, Zhang H, Cui Y, Chen B, Zhang X, Dai J, et al: A three-dimensional collagen scaffold cell culture system for screening anti-glioma therapeutics. *Oncotarget*. 7:56904–56914. 2016.
- MALEK R., Arribas R.L., PalominoAntolin A., Totoson P., Demougeot C., Koblrova T., Soukup O., Iriepa I., Moraleda I., Diez-Iriepa D. New Dual Small Molecules for Alzheimer’s Disease Therapy Combining Histamine H3 Receptor (H3R) Antagonism and Calcium Channels Blockade with Additional Cholinesterase Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62 (24) (2019), pp. 11416-11422.
- MARTÍNEZ ÁVILA H, Schwarz S, Feldmann EM, Mantas A, von Bomhard A, Gatenholm P, Rotter N. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Sep;98(17):7423-35. doi: 10.1007/s00253-014-5819-z. Epub 2014 May 28. PMID: 24866945.
- MIRI R, Javidnia K, Amirghofran Z, Salimi SH, Sabetghadam Z, Meili S, Mehdipour AR. Cytotoxic effect of some 1, 4-dihydropyridine derivatives containing nitroimidazole moiety. *Iran J Pharm Res*. 2011 Summer;10(3):497-503. PMID: 24250381; PMCID: PMC3813032.
- MOGHADAM, M .; Nasr Esfahani, M.; Tangestaninejad, S .; Mirkhani, V .; Zolfigol, MA Aromatização

biomimética de Hantzsch 1,4-dihidropiridinas com periodato de sódio catalisado por uma nova porfirina de manganês ligada ao poliestireno . *Lata. J. Chem.* 2006 , 84, 1 -4

MOHAMED M.F., Darweesh A.F., Elwahy A.H., Abdelhamid I.A. Synthesis, characterization and antitumor activity of novel tetrapodal 1, 4-dihydropyridines: p53 induction, cell cycle arrest and low damage effect on normal cells induced by genotoxic factor H₂O₂. *RSC Advances*, 6 (47) (2016), pp. 40900-40910.

MOHAMED M.F., Ibrahim N.S., Elwahy A.H., Abdelhamid I.A. Molecular Studies on Novel Antitumor Bis 1, 4-Dihydropyridine Derivatives Against Lung Carcinoma and their Limited Side Effects on Normal Melanocytes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18 (15) (2018), pp. 2156-2168

MOOSAVI-NASAB, Marzieh and Ali Reza Yousefi. "Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste." *Iranian Journal of Biotechnology* 9 (2011): 94-101.

NIAZ H., Kashtoh H., Khan J.A., Khan A., Alam M.T, Khan K.M., Perveen S., Choudhary M.I. Synthesis of diethyl 4-substituted-2, 6-dimethyl-1, 4-dihydropyridine-3, 5-dicarboxylates as a new series of inhibitors against yeast α -glucosidase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95 (2015), pp. 199-209.

NICOLETTI, N.F., Erig T.C., Zanin R.F., Roxo M.R., Ferreira N.P., Gomez M.V., Morrone F.B., Campos M.M. Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. *Toxicol.* 2017 Apr;129:58-67. doi: 10.1016/j.toxicol.2017.02.001. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28202361.

NIMESKERN L, Martínez Ávila H, Sundberg J, Gatenholm P, Müller R, Stok KS. Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013 Jun;22:12-21. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.03.005. Epub 2013 Mar 21. PMID: 23611922.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M. T. Antagonistas de canais de cálcio. *HiperAtivo*, Vol 5, No 2. Rio de Janeiro. Abril/Junho de 1998.

OLEJNÍKOVÁ P, Svorec L, Olšovská D, Panáková A, Vihonská Z, Kovaryová K, Marchalín S. Antimicrobial activity of novel c2-substituted 1,4-dihydropyridine analogues. *Sci Pharm.* 2014 Jan 12;82(2):221-32. doi: 10.3797/scipharm.1311-04. PMID: 24959401; PMCID: PMC4065119.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Folha informativa – Câncer. *Atualizada em setembro de 2018.* Acessada em <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>

ORGEL JPRO, Persikov AV, Antipova O (2014) Variation in the Helical Structure of Native Collagen. *PLoS ONE* 9 (2): e89519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089519>.

PALIT P, Ali N. Oral Therapy with Amlodipine and Lacidipine, 1,4-Dihydropyridine Derivatives Showing Activity against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jan;52(1):374-7. doi: 10.1128/AAC.00522-07. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17954702; PMCID: PMC2223878.

PANDYA, Hardik J. *et al.* A microfluidic platform for drug screening in a 3D cancer microenvironment. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 94, n. March, p. 632–642, 2017.

PARK, J.; PARK, Y.; JUNG, J. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 8, p. 83 – 88, 2003.

- PATHAK, A.; Kumar, S. Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness, *Integrative Biology*, Volume 3, Issue 4, April 2011, Pages 267–278, <https://doi.org/10.1039/c0ib00095g>
- PENG, Weijie *et al.* 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomaterialia*, v. 57, p. 26–46, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.025>>.
- PEPPAS NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. (2006) Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.*, 18, 1345–1360 DOI: 10.1002/adma.200501612.
- PÉRTILE, Renata A N *et al.* Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies. v. 5063, n. May, p. 1339–1354, 2012.
- PETER A. Ajibade, Fartisinha P. Andrew, Amos A. Fatokun, Abimbola E. Oluwalana, Synthesis, characterization and in vitro screening for anticancer potential of Mn(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), and Pt(II) methoxyphenyl dithiocarbamate complexes, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1230, 2021, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129894>.
- PINEDA E.T., Nerem R.M., Ahsan T. Differentiation patterns of embryonic stem cells in two-versus three-dimensional culture. *Cells Tissues Organs*. 2013;197:399–410.
- PIPPIN, J. Animal Research In Medical Sciences: Seeking A Convergence Of Science, Medicine, And Animal Law. *South Texas Law Review* 2013 ;54: 469 – 511.
- Plataforma 3D para Cultura de Células e Tecidos. Biocelltis.com, 2021. Disponível em <<https://www.biocelltis.com/cellfate>>. Acesso em Maio de 2021.
- POLLO LAE, de Moraes MH, Cisilotto J, Creczynski-Pasa TB, Biavatti MW, Steindel M, Sandjo LP. Synthesis and in vitro evaluation of Ca²⁺ channel blockers 1,4-dihydropyridines analogues against Trypanosoma cruzi and Leishmania amazonensis: SAR analysis. *Parasitol Int*. 2017 Dec;66(6):789-797. doi: 10.1016/j.parint.2017.08.005. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28801098.
- PONTES SOARES, C., Midlej, V., de Oliveira, M. E, Benchimol, M., Costa, M. L., and Mermelstein, C. (2012). 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PLoS One* 7:e38147. doi: 10.1371/journal.pone.0038147
- PRASANTHI G., Prasad K., Bharathi K. Design, synthesis and evaluation of dialkyl 4-(benzo [d][1, 3] dioxol-6-yl)-1, 4-dihydro-2, 6-dimethyl-1-substituted pyridine-3, 5-dicarboxylates as potential anticonvulsants and their molecular properties prediction. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66 (2013), pp. 516-525.
- PRASANTHI G., Prasad K., Bharathi K. Synthesis, anticonvulsant activity and molecular properties prediction of dialkyl 1-(di (ethoxycarbonyl) methyl)-2, 6-dimethyl-4-substituted-1, 4-dihydropyridine-3, 5-dicarboxylates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 73 (2014), pp. 97-104.
- PRAVEENKUMAR E., Gurrupu N., Kolluri P.K., Yerragunta V., Kunduru B.R., Subhashini N. Synthesis, anti-diabetic evaluation and molecular docking studies of 4-(1-aryl-1H-1, 2, 3-triazol-4-yl)-1, 4-dihydropyridine derivatives as novel 11-β hydroxysteroid dehydrogenase-1 (11β-HSD1) inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 90 (2019), Article 103056.
- PRESTWICH GD. Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: a pragmatic approach. *J Cell Biochem*. 2007; 101: 1370- 1383.
- RADADIYA A., Khedkar V., Bavishi A., Vala H., Thakrar S., Bhavsar D., Shah A., Coutinho E. Synthesis and 3D-QSAR study of 1, 4-dihydropyridine derivatives as MDR cancer reverters. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74 (2014), pp. 375-387
- RAMBO, C R *et al.* Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes

for tissue engineering. v. 28, p. 549–554, 2008.

RAVI, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., and Solomon, F. P. (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. *J. Cell. Physiol.* 230, 16–26. doi: 10.1002/jcp.24683

REBELO A, Liu Y, Liu C, Schäfer K, Saumer M, Yang G, Poly(4-vinylaniline)/polyaniline bilayer functionalized bacterial cellulose membranes as bioelectronics interfaces, *Carbohydrate Polymers*, Volume 204, 2019, Pages 190-201, ISSN 0144-8617, doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.017.

RECOUVREUX, Derce O S *et al.* Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. v. 31, p. 151–157, 2011.

REIMÃO JQ, Tempone AG. Investigation into in vitro anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106 (, 2011), pp. 1032 - 1038

REIS, EM ;BERTI, FV. ; COLLA, G ;PORTO, LM. . Bacterial nanocellulose-IKVAV hydrogel matrix modulates melanoma tumor cell adhesion and proliferation and induces vasculogenic mimicry in vitro. *Journal of biomedical materials research part b-applied biomaterials*, v. 106B, p. 2741-2749, 2017.

RESNIK DB, Tinkle SS. Ethical issues in clinical trials involving nanomedicine. *Contemp Clin Trials*. 2007 Jul;28(4):433-41. doi: 10.1016/j.cct.2006.11.001. Epub 2006 Nov 17. PMID: 17166777; PMCID: PMC2695593.

ROGERIO, K. R.; Vitória, F.; Kümmerle, A. E.; Graebin, C. S. Reações Multicomponentes: Um breve Histórico e a Versatilidade destas Reações na Síntese de Moléculas Bioativas. *Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (6), 1934-1962. Data de publicação na Web: 22 de dezembro de 2016

RUSSELL, S., Wojtkowiak, J., Neilson, A., and Gillies, R. J. (2017). Metabolic profiling of healthy and cancerous tissues in 2D and 3D. *Sci. Rep.* 7:15285. doi: 10.1038/s41598-017-15325-5

RYABOKON NI, Goncharova RI, Duburs G, Rzeszowska-Wolny J. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cells in vitro. *Mutat Res*. 2005 Nov 10;587(1-2):52-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.07.009. Epub 2005 Oct 3. PMID: 16202640.

SADDALA M.S., Kandimalla R., Adi P.J., Bhashyam S.S., Asupatri U.R. Novel 1, 4-dihydropyridines for L-type calcium channel as antagonists for cadmium toxicity. *Scientific Reports*, 7 (2017), p. 45211

SALEH NA, Rode MP, Sierra JA, Silva AH, Miyake JA, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB. Three-dimensional multicellular cell culture for anti-melanoma drug screening: focus on tumor microenvironment. *Cytotechnology*. 2021 Feb;73(1):35-48. doi: 10.1007/s10616-020-00440-5. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33505112; PMCID: PMC7817757.

SAINI, M. et al. Anti-tumor activity of Aloe vera against DMBA/croton oil-induced skin papillomagenesis in Swiss albino mice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, v.29, n.2, p.127-35, 2010.

SANI, A; Dahman, Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Roboken, v. 85, n. 2, p. 151-164, 2010.

SANTOS, W. Importância do estudo clínico: o caso da fosfoetanolamina. *Do Nano ao Macro*. São Paulo. 22 out. 2015. Disponível em <<http://www.nano-macro.com/2015/10/importancia-do-estudo-clinico-o-caso-da.html>>. Acesso em 14 Jul 2021.

SCHÖNHERR, R. Clinical Relevance of Ion Channels for Diagnosis and Therapy of Cancer. *J Membrane Biol* 205, 175–184 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0782-3>.

- SHAH N, Ul-Islam M, Khattak WA, Park JK. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydr Polym.* 2013 Nov 6;98(2):1585-98. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.018. Epub 2013 Aug 15. PMID: 24053844.
- SHAHRAKI O., Zargari F., Edraki N., Khoshneviszadeh M., Firuzi M., Miri R. Molecular dynamics simulation and molecular docking studies of 1, 4-Dihydropyridines as P-glycoprotein's allosteric inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36 (1) (2018), pp. 112-125.
- SICA DA. Pharmacotherapy review: calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006 Jan;8(1):53-6. doi: 10.1111/j.1524-6175.2005.04140.x. PMID: 16407690.
- SIDHOM PA, El-Bastawissy E, Salama AA, El-Moselhy TF. Revisiting ageless antiques; synthesis, biological evaluation, docking simulation and mechanistic insights of 1,4-Dihydropyridines as anticancer agents. *Bioorg Chem.* 2021 Jun 4;114:105054. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105054. Epub ahead of print. PMID: 34146919.
- SIMPSON CL, Patel DM, Green KJ (2011) Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:565–580. <https://doi.org/10.1038/nrm3175>
- SIRISHA K., Shekhar M.C., Umasankar K., Mahendar P., Sadanandam A., Achaiah G., Reddy V.M. Molecular docking studies and in vitro screening of new dihydropyridine derivatives as human MRP1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19 (10) (2011), pp. 3249-3254
- SONG H.-H.G., Park K.M., Gerecht S. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014;79–80:19–29.
- STUMPF TR, Yang X, Zhang J, Cao X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Jan 1;82:372-383. doi: 10.1016/j.msec.2016.11.121. Epub 2016 Nov 30. PMID: 29025671.
- SURI S., Schmidt C.E. Cell-laden hydrogel constructs of hyaluronic acid, collagen, and laminin for neural tissue engineering. *Tissue Eng.* 2010;16:1703–1716.
- SZOT CS, Buchanan CF, Gatenholm P., Rylander MN, Freeman JW Investigation of cancer cell behavior on nanofibrous scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C.* 2011; 31 : 37–42. doi: 10.1016 / j.msec.2009.12.005.
- TALUKDAR S. and Kundu S.C.: A non-mulberry silk fibroin protein based 3d in vitro tumor model for evaluation of anticancer drug activity. *Adv Funct Mat.* 22:4778–4788. 2012.
- TAZI, N., Zhang, Z., Messaddeq, Y., et al. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. *AMB Express*, v. 2, p. 61, 2012.
- TEMPONE AG, Taniwaki NN, Reimão JQ. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitol Res.* 2009 Aug;105(2):499-505. doi: 10.1007/s00436-009-1427-8. Epub 2009 Apr 8. PMID: 19352709.
- TORISAWA Y.S., Takagi A., Nashimoto Y., Yasukawa T., Shiku H., Matsue T. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. *Biomaterials.* 2007;28:559–566.
- TUNG, Y. C., Hsiao, A. Y., Allen, S. G., Torisawa, Y. S., Ho, M., and Takayama, S. (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 136, 473–478. doi: 10.1039/c0an00609b
- UL-ISLAM, M., Khan, T., and Park, J.K. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers* 88 (2): 596–603.
- ULLOORA S., Shabaraya R., Ranganathan R., Adhikari A.V. Synthesis, anticonvulsant and anti-inflammatory studies of new 1, 4-dihydropyridin-4-yl-phenoxyacetohydrazone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70 (2013), pp. 341-349.

- VALENTE S., Mellini P., Spallotta F., Carafa V., Nebbioso A., Polletta L., Carnevale I., Saladini S., Trisciuglio D., Gabellini C. 1, 4-Dihydropyridines active on the SIRT1/AMPK pathway ameliorate skin repair and mitochondrial function and exhibit inhibition of proliferation in cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59 (4) (2016), pp. 1471-1491
- VAN-MINH, L., Mei-Dong, L., Wei-Bin, S., and Jian-Wen, L. (2016). A collagen-based multicellular tumor spheroid model for evaluation of the efficiency of nanoparticle drug delivery. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44, 540–544. doi: 10.3109/21691401.2014.968820
- WANG J, Zhao L, Zhang A, Huang Y, Tavakoli J, Tang Y. Novel Bacterial Cellulose/Gelatin Hydrogels as 3D Scaffolds for Tumor Cell Culture. *Polymers (Basel)*. 2018 May 24;10(6):581. doi: 10.3390/polym10060581. PMID: 30966615; PMCID: PMC6403570.
- WANG J, Zhou P. New Approaches in CAR-T Cell Immunotherapy for Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1026:371-381. doi: 10.1007/978-981-10-6020-5_17. PMID: 29282693.
- WANG J., Gao C., Zhang Y., Wan Y. Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 30, Issue 1, 2010, Pages 214-218, ISSN 0928-4931, doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.006.
- WANG M., Sun Y., Li L., Wu P., Dkw O., Shi H. Calcium Channels: Noteworthy Regulators and Therapeutic Targets in Dermatological Diseases. *Front Pharmacol*. 2021 Aug 19;12:702264. doi: 10.3389/fphar.2021.702264. PMID: 34489697; PMCID: PMC8418299.
- WU, Ruijun *et al.* Rapid screening of multi-target antitumor drugs by nonimmobilized tumor cells/tissues capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 1045, p. 152–161, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.015>>.
- XIN, Xin *et al.* 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. *Process Biochemistry*, v. 78, n. September 2018, p. 148–160, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.028>>.
- XU X, Sabanayagam CR, Harrington DA, Farach-Carson MC and Jia X: A hydrogel-based tumor model for the evaluation of nanoparticle-based cancer therapeutics. *Biomaterials*. 35:3319–3330. 2014
- XU Z, Gao Y, Hao Y, Li E, Wang Y, Zhang J, Wang W, Gao Z and Wang Q: Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials*. 34:4109–4117. 2013
- YAMAKAGE, M., Namiki, A. Calcium channels — basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels — a review. *Can J Anesth* 49, 151–164 (2002). <https://doi.org/10.1007/BF03020488>
- YANG Z and Zhao X: A 3D model of ovarian cancer cell lines on peptide nanofiber scaffold to explore the cell-scaffold interaction and chemotherapeutic resistance of anticancer drugs. *Int J Nanomedicine*. 6:303–310. 2011.
- YOUSUF H., Shamim S., Khan K.M., Chigurupati S., Hameed S., Khan M.N., Taha M., Arfeen M. Dihydropyridines as potential α -amylase and α -glucosidase inhibitors: synthesis, in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry*, 96 (2020), Article 103581.
- YUAN, Tianying *et al.* Co-culture of tumor spheroids and monocytes in a collagen matrix-embedded microfluidic device to study the migration of breast cancer cells. *Chinese Chemical Letters*, v. 30, n. 2, p. 331–336, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.07.013>>.
- ZABOROWSKA M., Bodin A., Bakdahl H., Popp J., Goldstein A., Gatenholm P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2010;6:2540–2547. doi: 10.1016/j.actbio.2010.01.004.
- ZHAI, Jiao *et al.* Cell-based drug screening on microfluidics. *TrAC - Trends in Analytical*

Chemistry, n. xxxx, 2019.

ZHANG, G., Zheng, H., Zhang, G. *et al.* MicroRNA-338-3p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer by targeting sphingosine kinase 2. *Cancer Cell Int* **17**, 46 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0415-9>