

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - *CAMPUS* GOVERNADOR
VALADARES

SABRINA ROCHA DA SILVA

**PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS
TRIDIMENSIONAIS DE GLIOBLASTOMA**

Governador Valadares

2024

SABRINA ROCHA DA SILVA

**PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS
TRIDIMENSIONAIS DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Farmácia do Instituto de Ciências da Vida da Universidade Federal de Juiz de Fora - *Campus* Governador Valadares como pré-requisito para a obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa.D^{ra} Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Governador Valadares

2024

SABRINA ROCHA DA SILVA

**PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS
TRIDIMENSIONAIS DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao Curso de Farmácia
do Instituto de Ciências da Vida da
Universidade Federal de Juiz de
Fora - *Campus* Governador
Valadares como pré-requisito parcial
para a obtenção do título de bacharel
em Farmácia.

Governador Valadares, ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Prof. Dr. João Eustáquio Antunes

Prof. Dr. Leonardo Meneghin Mendonça

AGRADECIMENTOS

É realmente surpreendente, quase assustador, quantos eventos ocorreram entre meu ingresso na graduação e a conclusão deste trabalho. Recebi a ajuda de muitas pessoas nesse conturbado período, e espero conseguir agradecer devidamente a todas elas.

À Profa.^a Dra.^a Michelle Bueno, por gentilmente me aceitar como orientanda, por ter sido compreensiva durante todo esse tempo e pelos valiosos conselhos no desenvolvimento dessa pesquisa.

A Me. Ana Carolina Menezes, pelos importantes ensinamentos e por ter feito o máximo para se fazer disponível pelo seu tempo e conselhos no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, Jader (in memoriam) e Nilda, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões, por me incentivarem nos momentos difíceis e compreenderem a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização da graduação, permitindo-me chegar até onde cheguei e ser quem sou.

Às minhas irmãs, Alessandra e Ana Luiza, minha sobrinha Luara, Tia Renilda, Joana, Ney, minhas primas Gabriele e Ana Cláudia que sempre estiveram ao meu lado, pelo amor incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

Aos meus amigos Lorrane, Emily, Tânia, Evelyn, Lucas, Marcos, Rosângela, Samuel, Yuri, Ernane, Thalisson e Elves Lucas que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

Aos meus colegas de serviço que me apoiaram e incentivaram a não desistir e a colaborar nessa fase Paula, Maike, Ana Livia, Angelo, Adriana, Alexandra, Ayla, Rose, Terezinha, Pollyana, Ellen, Luis Gustavo, João Pedro, Thiago, Carlos e Eliene.

Gratidão a cada um que fez parte dessa caminhada.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo o glioblastoma um tumor cerebral primário mais comum e agressivo, com mau prognóstico e baixa sobrevida. O presente estudo teve como objetivo padronizar e caracterizar um modelo tridimensional (3D) de glioblastoma com as linhagens celulares U87-MG e T98G. Foi utilizada a técnica de sobreposição líquida com agarose para impedir a adesão celular e promover a formação de esferoides. O crescimento dos esferoides foi monitorado durante 7 dias, avaliando-se o diâmetro e a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT, que destacou a influência da densidade celular inicial no comportamento das células tumorais. Os resultados mostraram que a concentração inicial de células afeta diretamente o tamanho e a viabilidade dos esferoides, com esferoides maiores formados em concentrações mais elevadas. O modelo 3D apresenta potencial na simulação do microambiente tumoral, configurando-se como uma ferramenta promissora para futuros estudos de novos tratamentos contra o glioblastoma, devido à sua capacidade de replicar as interações celulares de tumores sólidos.

Palavras-chaves: Cultura celular 3D, técnicas *in vitro*, câncer, esferoide.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of mortality worldwide, with glioblastoma (GBM) being the most common and aggressive primary brain tumor, characterized by a poor survival prognosis. This study aimed to provide a more accurate platform for investigating cell growth and treatment responses in brain tumors by standardizing and characterizing a three-dimensional (3D) glioblastoma model using U87-MG and T98G cell lines. The liquid overlay technique with agarose was used to prevent cell adhesion and promote spheroid formation. Spheroid growth was monitored over 7 days, assessing diameter and cell viability through the MTT assay, which highlighted the influence of initial cell density on tumor cell behavior. The results showed that the initial cell concentration directly affects the size and viability of the spheroids, with larger spheroids formed at higher concentrations. The 3D model shows potential in simulating the tumor microenvironment, positioning itself as a promising tool for future studies of new treatments for glioblastoma, due to its ability to replicate the cellular interactions of solid tumors.

KEYWORDS: Glioblastoma, 3D cell culture, *in vitro* techniques, câncer, spheroids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de sobrevida em meses de pacientes com glioblastoma.

Figura 2 - Fluxograma da padronização dos métodos, utilizando a linhagem U87-MG

Figura 3 - Fluxograma da caracterização dos esferoides, usando a linhagem T98G

Figura 4 - Análise Temporal de Concentrações Celulares em Agarose 2% (PBS): Crescimento Celular ao Longo de 4 Dias.

Figura 5 - Análise Temporal de Concentrações Celulares em Agarose 2% (Água): Crescimento Celular ao Longo de 4 Dias.

Figura 6 - Comparação do Crescimento Celular entre Agarose 2% em PBS e Agarose 2% em Água ao Longo de 4 Dias (Modelo 2)

Figura 7 - Avaliação do crescimento de esferoides celulares em um meio de ao longo de sete dias, em diferentes concentrações iniciais de células.

Figura 8 - Variação do tamanho dos esferoides (em área) ao longo de 7 dias em diferentes concentrações celulares iniciais.

Figura 9 - Comparação da absorvância de esferoides em diferentes concentrações no 4º e 7º dia de cultivo.

LISTA DE SIGLAS

2D - Bidimensional
3D - Tridimensional
ACNU - Nimustina
BCNU - Carmustina
CCNU - Temozolomida lomustina CIPOI - Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância
BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro
DMEM - Eagle modificado de Dulbecco
DMSO - Dimetilsulfóxido (DMSO)
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DTI - Imagem por tensor de difusão
ERM - Espectroscopia por ressonância magnética
ECM - Matriz extracelular
FEC-1 - Fator estimulante de colônia 1
FCE - Fator de crescimento epidérmico
GBM - Glioblastoma
GFAP - Proteína ácida fibrilar glial
GSC- *Glioma Stem Cells*
IHC - Imunohistoquímica
ICC - Imunocitoquímica
IDH - Isocitrato Desidrogenase
MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5- fenil brometo de tetrazolina)
NIH -National Institutes of Health
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Tampão fosfato salino
RM - Ressonância magnética
RMN - Ressonância magnética nuclear
RPM- Rotações por minuto
SNC - Sistema nervoso central
SFB - Soro fetal bovino
TKIs - Tirosina quinase
TMZ - Tratamento de glioblastoma
UNICAMP - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

μm - micrômetro

UV - Ultravioleta

VEGF -Fator de crescimento endotelial vascular

- 1 INTRODUÇÃO
- 2 REFERENCIAL TEÓRICO
 - 2.1 Glioblastoma
 - 2.1.1 Dados epidemiológicos
 - 2.1.2 Achados clínicos e laboratoriais
 - 2.1.3 Diagnóstico
 - 2.1.4 Tratamento
 - 2.2 Cultura de células
 - 2.2.1 Cultura de células 2D
 - 2.2.2 Cultura de células 3D
- 3 OBJETIVOS
 - 3.1 Objetivo geral
 - 3.2 Objetivos específicos
- 4 METODOLOGIA
 - 4.1 Cultura de células 2D
 - 4.2 Cultura de células 3D
 - 4.2.1 Caracterização dos esferoides
 - 4.2.2 Viabilidade da cultura de células 3D
 - 4.2.3 Análise gráfica
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO
 - 5.1 Padronização da cultura celular 3D
 - 5.2 Caracterização da cultura de células 3D
 - 5.2.1 Avaliação do diâmetro dos esferoides
 - 5.2.2 Avaliação da viabilidade celular 3D
6. CONCLUSÃO
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 INTRODUÇÃO

A palavra “câncer” é derivada da palavra grega “karkínos”, que significa caranguejo, e foi usada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu de 460 a 377 a.c. Câncer é um termo genérico usado para descrever mais de 100 doenças, todas caracterizadas por crescimento celular desordenado e tendência a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA,2020). Há mais de 100 tipos distintos de câncer, cada um com características clínicas e biológicas variadas, que precisam ser estudadas para que o diagnóstico, o tratamento e o acompanhamento sejam apropriados (INCA 2020).

O câncer é uma das maiores causas de óbito em todo o mundo, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares nos países desenvolvidos. Para as próximas décadas, já é esperado o dobro do número de pessoas diagnosticadas com os mais diferentes tipos de cânceres, aumentando a demanda por novos métodos de diagnósticos e tratamento (De Mejia et al., 2003).

O câncer é responsável por cerca de 9,6 milhões de óbitos, ou 1 em cada 6 mortes no mundo. Entre os homens, os tipos mais comuns de câncer são pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado, enquanto entre as mulheres, os mais comuns são mama, colorretal, pulmão, colo do útero e tireoide (OMS, 2020).

O câncer pode acometer qualquer órgão ou tecido do corpo, quando células anormais crescem descontroladamente, ultrapassam seus limites habituais e invadem partes adjacentes do corpo e/ou se espalham para outros órgãos. Esse último processo é chamado metástase e é uma das principais causas de morte por câncer. Neoplasia e tumor maligno são outros termos comuns para o câncer (OMS, 2020).

Uma célula normal pode sofrer mutações genéticas que alteram seu funcionamento, levando a instruções equivocadas que resultam em proliferação acelerada e resistência à apoptose, um processo natural de morte celular. Esse conjunto de mudanças pode dar início à carcinogênese, que é dividida em três estágios principais. No primeiro estágio, a iniciação, ocorrem mutações genéticas induzidas por agentes carcinogênicos. O segundo estágio, a promoção, envolve a ação de substâncias oncopromotoras que favorecem o crescimento das células já alteradas. Finalmente, o estágio de progressão é caracterizado pela proliferação irreversível e descontrolada das células mutantes, resultando no desenvolvimento do câncer (MDPI, 2023).

As células cancerosas podem se espalhar pelos vasos sanguíneos ou linfáticos e alcançar órgãos distantes do tumor original. Esse processo, conhecido como metástase, ocorre quando a célula cancerosa perde suas funções normais, levando a uma proliferação acelerada e agressiva. Tumores malignos apresentam variações marcantes na expressão gênica, com várias anormalidades genéticas que impulsionam sua progressão. Essas mutações promovem tanto a invasão quanto a proliferação descontrolada, características típicas das neoplasias malignas (MDPI, 2021; BMC Cancer, 2023).

Os gliomas são tumores cerebrais primários que se originam de células-tronco neurais, células neuro-progenitoras, progenitores gliais, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (Sanai et al., 2005). Eles representam cerca de 80% das neoplasias primárias do sistema nervoso central (SNC), sendo os tumores cerebrais mais comuns (Ohgaki, 2009; Louis et al., 2016). A classificação mais recente da OMS subdividiu os gliomas em várias categorias, incluindo gliomas difusos adultos e pediátricos, tumores glioneuronais e neuronais, e tumores endimais (Louis et al., 2021). O glioblastoma (GBM) é o glioma difuso adulto com pior prognóstico, sendo o tipo mais frequente, maligno e letal, correspondendo a 55,6% dos gliomas e 46,1% de todos os tumores do SNC em adultos (Ostrom et al., 2018).

Os tumores diretamente relacionados ao sistema nervoso, como o glioblastoma, continuam a representar um grande desafio para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e tratamento. Em razão disso, muitas pesquisas são realizadas globalmente com o objetivo de encontrar novas modalidades de tratamento para essas neoplasias (Weller et al., 2012). Infelizmente, essas patologias continuam associadas a uma elevada taxa de mortalidade, com poucos avanços significativos nas expectativas de vida dos pacientes, apesar dos tratamentos disponíveis. Mesmo com terapias modernas, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, o prognóstico permanece desafiador para a maioria dos pacientes (Hertler et al., 2023).

No estudo de glioblastoma, os cultivos celulares são amplamente utilizados como modelos experimentais, permitindo a investigação de diversos aspectos biológicos e terapêuticos. Entre as abordagens aplicadas, destacam-se a imunohistoquímica (IHC) e a imunocitoquímica (ICC), técnicas fundamentais para a caracterização das células tumorais. A IHC é utilizada para analisar a expressão de

proteínas em tecidos, permitindo a identificação de biomarcadores específicos diretamente em amostras tumorais. Já a ICC é aplicada em culturas celulares, sendo útil para investigar a presença e distribuição de proteínas específicas dentro das células isoladas, possibilitando uma análise mais detalhada dos componentes celulares. Ambas as técnicas são cruciais para a compreensão da biologia do glioblastoma, ajudando a definir perfis moleculares que podem orientar diagnósticos e estratégias terapêuticas. Essas técnicas utilizam anticorpos específicos para detectar proteínas de interesse, como GFAP (proteína ácida fibrilar glial) e S-100, que são marcadores de células gliais (Pavon et al., 2012).

A análise citogenética é utilizada para avaliar alterações cromossômicas em células de glioblastoma. Essa análise pode revelar aneuploidia e outras anomalias cromossômicas que são comuns em células tumorais (Agani, 2018).

Modelos tridimensionais (3D) podem ser usados para testar a resposta de células tumorais a diferentes tratamentos, permitindo a personalização da terapia com base nas características únicas de cada tumor.(Pampaloni, 2007; Lancaster et al.,2014; Pavon. et al,2012).

Os modelos 3D de cultura de células são ferramentas poderosas para o estudo e tratamento do glioblastoma, eles fornecem um ambiente mais realista para a avaliação de novos compostos, acelerando o desenvolvimento de fármacos eficazes contra o glioblastoma. Eles oferecem uma plataforma mais precisa para entender a biologia do tumor, testar novas terapias e desenvolver estratégias personalizadas, potencialmente melhorando os resultados clínicos para pacientes com esta forma agressiva de câncer cerebral (Pampaloni, 2007; Lancaster et al.,2014; Pavon., et al,2012).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Glioblastoma

Os gliomas são classificados em diversos grupos com base em suas características histopatológicas (Ohgaki, 2005). Os principais tipos de glioma são: oligodendrogliomas e astrocitomas. Segundo a classificação da OMS de 2021, os oligodendrogliomas permanecem classificados como tumores de grau 2, caracterizados por um crescimento lento. Contudo, a nova classificação ressalta a

relevância das mutações nos genes *IDH1/2* e da co-deleção 1p/19q como critérios diagnósticos fundamentais para esses tumores. Em casos de recorrência, esses oligodendrogliomas podem progredir para uma forma mais agressiva, conhecida como oligodendroglioma anaplásico de grau 3, que se distingue por apresentar alta atividade mitótica e necrose (Louis et al., 2021).

Por outro lado, os astrocitomas são classificados conforme seu grau de malignidade e agressividade. Em ordem crescente de malignidade, eles são denominados: astrocitoma pilocítico (grau 1) é benigno, de crescimento lento e mais comum em crianças, com bom prognóstico após remoção cirúrgica. O astrocitoma difuso (grau 2) tem um crescimento lento, porém infiltrativo, o que dificulta sua remoção completa e requer acompanhamento e, em alguns casos, radioterapia. O astrocitoma anaplásico (grau 3) é mais agressivo, com rápida proliferação celular, exigindo tratamentos intensivos como cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Já o glioblastoma (grau 4), é o mais agressivo, caracteriza-se por crescimento rápido e invasivo, com um prognóstico reservado e sobrevida média de 15 meses, mesmo com tratamentos combinados (Louis et al, 2021; Fernandes et al.,2023). O GBM apresenta características marcantes, como atipia nuclear, rápido crescimento, proliferação microvascular, necrose, instabilidade genética e resistência a quimioterapia (Furnari et al., 2007). Devido a essas características, o prognóstico do GBM é geralmente desfavorável para indivíduos diagnosticados com este tipo de tumor com uma expectativa de vida média pós-diagnóstico entre 12 a 15 meses. Apenas 3 a 5% dos pacientes têm a possibilidade de viver além de cinco anos, e, infelizmente, a condição é invariavelmente fatal (Gallego.,2015; *International Agency for Research Cancer*, 2014).

GBM se origina nas células gliais, especificamente nos astrócitos, que são células de suporte do sistema nervoso central. Esse tipo de tumor é mais comum em adultos entre 45 e 70 anos, caracterizando-se pelo seu rápido crescimento e alta resistência aos tratamentos convencionais (NHI, 2023). Podem ser classificados como primários ou secundários. Os tumores primários, ou de novo, ocorrem quando o diagnóstico é realizado na primeira biópsia, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica de uma lesão precursora menos maligna, ou seja, na ausência de uma neoplasia pré-existente de grau inferior. Em contraste, o GBM secundário é caracterizado pela progressão de um astrocitoma de grau inferior para um grau mais elevado de malignidade (Ohgaki et al., 2005; Furnari et al., 2007).

Sua fisiopatologia é caracterizada por uma série de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem a um crescimento tumoral agressivo e invasivo. Entre as principais mutações genéticas associadas ao glioblastoma estão a amplificação do gene *EGFR*, a deleção do gene *PTEN* e as mutações no gene *IDH1/IDH2*, sendo esta última menos comum, mas associada a um prognóstico mais favorável quando presente (TCGA, 2008). Atualmente, sua nomenclatura refere-se a Glioblastoma, *IDH-wildtype*, em referência ao gene da proteína Isocitrato Desidrogenase (IDH) um importante biomarcador na classificação de gliomas (Valadares et al, 2021).

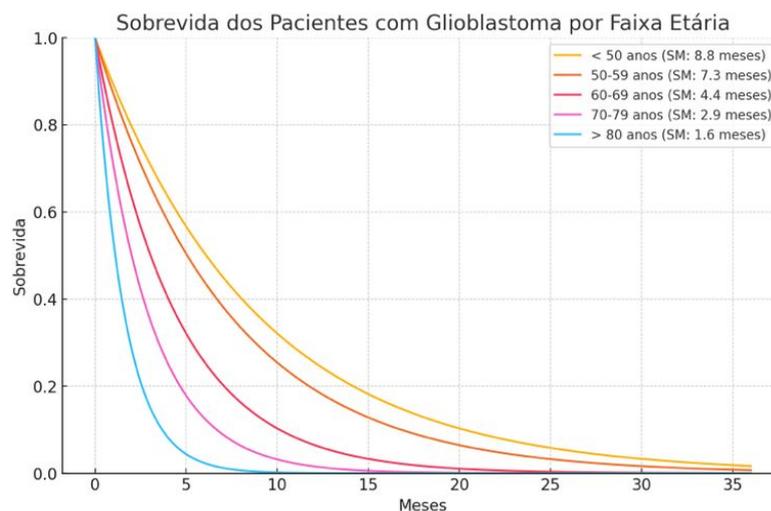
A angiogênese desempenha um papel fundamental na progressão do glioblastoma, sendo intensamente estimulada pela expressão elevada do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF facilita a formação de uma rede vascular anômala, que, embora forneça oxigênio e nutrientes ao tumor, é muitas vezes desorganizada e ineficaz. Essa ineficiência contribui para a hipóxia no interior do tumor, uma condição que paradoxalmente promove ainda mais a angiogênese e intensifica a agressividade do glioblastoma. A hipóxia ativa o fator de transcrição HIF-1 α , que regula a expressão de vários genes pró-angiogênicos, incluindo o próprio *VEGF*, criando um ciclo vicioso que mantém o crescimento e a invasão tumoral. Estudos recentes sugerem que o microambiente hipóxico do glioblastoma pode aumentar a resistência às terapias antiangiogênicas, como as que bloqueiam o VEGF, indicando a necessidade de novas abordagens terapêuticas que possam superar essas barreiras (Balandeh et al.,2021;Takahashi et al.,2015).

O GBM apresenta um padrão histológico altamente heterogêneo, caracterizado por interações complexas entre tecidos neoplásicos e estromais (Agnihotri et al., 2013). O crescimento tumoral pode ser guiado por fatores estocásticos ou hierárquicos (Vescovi et al., 2006). Especificamente no GBM, essas células são denominadas *Glioma Stem Cells* (GSC) que possuem alta capacidade de iniciar e promover o crescimento tumoral, sendo frequentemente associadas à recidiva e à resistência às terapias, devido a vários mecanismos, incluindo uma maior capacidade de reparo do DNA (Bao et al., 2006; Ctalao et al., 2011; Cheray et al., 2017).

2.1.1 Dados epidemiológicos

O glioblastoma é o tumor cerebral maligno primário mais comum e agressivo, com uma incidência de cerca de 3 a 5 casos por 100.000 pessoas por ano, representando aproximadamente 48,6% de todos os tumores malignos do sistema nervoso central e 14,6% de todos os tumores cerebrais (Ostrom et al., 2021). Esse tipo de tumor afeta principalmente adultos, sendo mais comum em pessoas com idade entre 45 e 70 anos, com a média de idade ao diagnóstico em torno de 64 anos (Louis et al., 2016). A idade dos pacientes é o principal fator preditivo de sobrevida, sendo que pacientes mais idosos geralmente apresentam uma menor sobrevida (Figura 1). Os homens são mais frequentemente acometidos do que as mulheres, com uma proporção de aproximadamente 1,6:1 (Ostrom et al., 2021). Além disso, o glioblastoma tende a ser mais prevalente em indivíduos de origem caucasiana em comparação com outras etnias, embora fatores socioeconômicos e acesso a cuidados de saúde também possam influenciar essas variações (Bondy et al., 2008).

Figura 1 - Curva de sobrevida em meses de pacientes com glioblastoma.



Legenda: A curva mostra que idade é um fator preditivo de sobrevida para glioblastoma. A menor idade dos pacientes é um fator significativo de sobrevida mais longa. SM: sobrevida média.

FONTE :Gráfico adaptado de Ohgaki e Kleihues 2005.

O prognóstico para pacientes com glioblastoma permanece desfavorável, com uma sobrevida mediana de aproximadamente 12 a 15 meses, mesmo com o tratamento padrão que inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolomida. Pesquisas recentes continuam a confirmar que a taxa de sobrevivência em cinco anos é inferior a 10% (Stupp et al., 2005; Karger, 2023). Novos tratamentos, como a imunoterapia combinada com viroterapia, têm demonstrado sinais promissores, especialmente no tratamento de tumores recidivantes, embora a eficácia a longo prazo desses métodos ainda precise de mais avaliação (Brigham and Women's Hospital, 2023).

Os principais fatores de risco para o glioblastoma incluem a exposição prévia à radiação ionizante, com destaque para aqueles que passaram por radioterapia craniana. Além disso, síndromes genéticas, como a síndrome de Li-Fraumeni, neurofibromatose tipo 1 e a síndrome de Turcot, estão fortemente associadas a um risco aumentado de desenvolvimento desse tumor (Schwartzbaum et al., 2006; Karger, 2023).

Pesquisas recentes também indicam que terapias personalizadas, bem como a identificação de mutações genéticas específicas, como a metilação do promotor *MGMT* e as mutações nos genes *IDH1/IDH2*, podem melhorar o prognóstico em alguns casos, embora o glioblastoma continue sendo altamente resistente a muitos tratamentos (Haque et al., 2022).

2.1.2 Achados clínicos e laboratoriais

GBM apresenta uma ampla gama de sinais, sintomas e achados clínicos, que variam conforme a localização, o tamanho e a velocidade de crescimento do tumor. A identificação precoce desses sinais é essencial para o diagnóstico e manejo eficaz da doença, influenciando diretamente o prognóstico dos pacientes (Omuro & Deangelis, 2013).

Os sinais e sintomas de GBM são decorrentes da invasão e da compressão do tecido cerebral pelos tumores em crescimento, que podem incluir dor de cabeça, problemas de memória, fraqueza em um lado do corpo, dificuldades para pensar e falar, sonolência, náuseas, vômitos e convulsões. Em alguns casos, os sintomas surgem de forma súbita e intensa; contudo, para outros pacientes, as manifestações podem ocorrer gradualmente, apresentando alterações na linguagem, concentração,

coordenação motora ou força em um lado do corpo (*NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 2017; Omuro & Deangelis, 2013).

A cefaleia é o sintoma mais comum entre os pacientes com glioblastoma, ocorrendo em aproximadamente 50% dos casos. A dor de cabeça tende a ser progressiva e geralmente é mais intensa nas primeiras horas da manhã, frequentemente associada ao aumento da pressão intracraniana decorrente do edema cerebral ou do efeito de massa do tumor (Campbell et al., 2012).

Convulsões ocorrem em 20-40% dos pacientes e podem ser uma das primeiras manifestações clínicas do glioblastoma. As convulsões variam em apresentação, podendo ser focais ou generalizadas, dependendo da localização da lesão no cérebro. Essas crises epiléticas refletem a irritação do córtex cerebral pelo tumor (Lacroix et al., 2001).

Déficits neurológicos focais são comuns e variam conforme a área do cérebro afetada. Esses déficits podem incluir hemiparesia (fraqueza de um lado do corpo), afasia (dificuldade na fala), hemianopsia (perda de parte do campo visual) e perda sensorial. Esses sintomas indicam a invasão do tumor em áreas específicas do cérebro responsáveis por essas funções (Wen & Cairncross, 2010).

Alterações cognitivas e comportamentais são frequentes em pacientes com glioblastoma, especialmente quando o tumor afeta os lobos frontais e temporais. Essas alterações podem se manifestar como mudanças de personalidade, confusão mental, dificuldades de concentração e perda de memória, sintomas que tendem a piorar com a progressão da doença (Omuro & Deangelis, 2013).

Náuseas e vômitos são frequentemente associados ao aumento da pressão intracraniana, especialmente em fases mais avançadas da doença. Esses sintomas resultam do efeito de massa do tumor e do edema associado, que comprimem estruturas cerebrais e o sistema ventricular (Lacroix et al., 2001).

A fadiga é outro sintoma comum, exacerbado tanto pela progressão da doença quanto pelos tratamentos oncológicos. Os pacientes frequentemente relatam cansaço extremo, que interfere na qualidade de vida e na capacidade de realizar atividades diárias (Stupp et al., 2005).

O exame clínico e as técnicas de neuroimagem desempenham um papel essencial na confirmação do diagnóstico de glioblastoma. Dentre os achados clínicos mais relevantes, destacam-se o papiledema e os resultados obtidos por meio de exames de imagem e análise histopatológica (Louis et al., 2016).

O papiledema, detectado através de exame oftalmológico, é um indicativo importante do aumento da pressão intracraniana. Este achado resulta do inchaço do nervo óptico, causado pela pressão elevada dentro do crânio, que é consequência do efeito de massa do tumor e do edema cerebral circundante (Campbell et al., 2012).

As imagens de neuroimagem, especialmente as obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN), são fundamentais para o diagnóstico do glioblastoma. Na RMN, o glioblastoma geralmente se apresenta como uma lesão heterogênea, caracterizada por captação de contraste em anel e edema peritumoral. Essas características são cruciais para diferenciar o glioblastoma de outros tipos de tumores cerebrais e lesões benignas (Wen & Cairncross, 2010).

A histopatologia é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico definitivo do glioblastoma. A biópsia do tumor revela características patognomônicas, como pleomorfismo celular, mitoses frequentes, proliferação microvascular e necrose em pseudopaliçada. Essas características são indicativas do alto grau de malignidade do glioblastoma, confirmando o diagnóstico (Louis et al., 2016).

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico de gliomas é geralmente realizado por meio de exames de imagem especialmente em indivíduos que apresentam sinais clínicos indicativos de lesão intracraniana, como mudanças de personalidade, deficiências neurológicas, convulsões e cefaleias frequentes (Weller, 2011). A RMN é o principal exame utilizado para o diagnóstico. No entanto, a confirmação e a classificação do tumor dependem da análise histopatológica obtida através de uma biópsia ou da ressecção cirúrgica do tumor (Rosseau et al., 2008). Os gliomas ainda não possuem um programa de triagem clínica eficaz devido à ausência de biomarcadores plasmáticos específicos e sua baixa incidência. Embora recentes descobertas sobre proteínas e microRNAs circulantes como potenciais biomarcadores sejam promissoras, esses métodos ainda não fazem parte da prática clínica comum. Fatores preditivos atuais, como mutações nos genes *IDH1*, *TERT* e *CDKN2A*, não conseguem, isoladamente, determinar com precisão a melhor abordagem terapêutica. Pesquisas continuam em busca de melhorar a sensibilidade e

especificidade desses biomarcadores, mas a implementação clínica enfrenta desafios significativos (MDPI, 2021; Frontiers, 2023).

A RMN desempenha um papel fundamental não apenas na detecção inicial dos gliomas, mas também no planejamento cirúrgico e na avaliação da extensão do tumor, sendo essencial para diferenciar entre tecido tumoral e edema peritumoral (Weller, 2011). Além disso, técnicas avançadas de imagem, como a espectroscopia por ressonância magnética (ERM) , a imagem por tensor de difusão (DTI) e a imagem ponderada por perfusão, têm sido cada vez mais empregadas para fornecer informações detalhadas sobre a composição do tumor e sua vascularização, o que pode ser crucial na distinção entre gliomas de baixo e alto grau (Tabatabai et al., 2010).

Apesar dos avanços nas técnicas de imagem, o diagnóstico definitivo e a classificação do grau do glioma, que são essenciais para o prognóstico e para a escolha da abordagem terapêutica, ainda dependem da avaliação histopatológica, complementada mais recentemente pela análise molecular. Mutações genéticas, como as no gene *IDH1/IDH2*, a co-deleção dos cromossomos 1p/19q e a metilação do gene *MGMT*, têm se mostrado determinantes na classificação dos gliomas, influenciando também o prognóstico e a resposta a tratamentos específicos (Rosseau et al., 2008).

A ausência de biomarcadores plasmáticos confiáveis limita a capacidade de monitorar a progressão da doença ou a resposta ao tratamento de forma não invasiva. Por isso, a pesquisa continua voltada para a identificação de biomarcadores moleculares e para o desenvolvimento de terapias personalizadas sendo um ponto central para melhorar o manejo clínico de pacientes com gliomas, que frequentemente apresentam alta taxa de recorrência e um prognóstico reservado (Weller, 2011; Tabatabai et al., 2010).

Esses elementos destacam a complexidade envolvida no diagnóstico e tratamento dos gliomas e enfatizam a necessidade de abordagens integradas que combinam técnicas de imagem avançadas, análises moleculares e estratégias terapêuticas personalizadas para melhorar os desfechos clínicos dos pacientes.

2.1.4 Tratamento

As estratégias de tratamento dos GBMs são muito limitadas. Apesar dos avanços das técnicas cirúrgicas, a cirurgia não é capaz de promover a cura devido à alta capacidade das células tumorais em infiltrar o parênquima cerebral. Muitos pesquisadores sugerem que a extensão da ressecção tem valor prognóstico (Sanai et al., 2008). A sobrevida média após a cirurgia para pacientes com GBM é geralmente inferior a 12 meses, especialmente em casos de recorrência ou quando o tratamento não inclui radioterapia e quimioterapia. Pacientes que recebem tratamentos mais agressivos podem alcançar uma sobrevida de 15 a 18 meses, mas, na maioria dos casos, a sobrevida permanece em torno de 12 meses. Embora o tratamento combinado com temozolomida (TMZ) ofereça uma leve melhora, o GBM é altamente agressivo, e poucos pacientes sobrevivem além de dois anos após o diagnóstico (Frontiers, 2023; *The Brain Tumour Charity*, 2023). A radioterapia fracionada pode aumentar a sobrevida dos pacientes em cerca de três meses. Já o papel dos quimioterápicos na sobrevida dos pacientes com GBM ainda é controverso, uma vez que diversos estudos não identificaram diferenças significativas em comparação ao tratamento com radioterapia. Isso se deve, em parte, à dificuldade de penetração dos agentes citotóxicos no sistema nervoso central e à resistência a múltiplas drogas.

Atualmente, o agente alquilante, TMZ, é o tratamento preferencial. Infelizmente, a taxa de sobrevida geral dos pacientes tratados continua sendo de apenas 12 a 15 meses após a terapia, com menos de 10% dos pacientes sobrevivendo por períodos mais longos (*NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 2023).

Antes da introdução da temozolomida (TMZ), agentes alquilantes como as nitrosuréias, incluindo lomustina (CCNU), carmustina (BCNU) e nimustina (ACNU), bem como inibidores de topoisomerase, como o etoposídeo, eram comumente utilizados no tratamento de glioblastomas (Wolff et al., 2008).

Diversos estudos clínicos em andamento estão avaliando o uso de inibidores de tirosina quinase (*TKIs*), anticorpos monoclonais e outras terapias alvo-específicas no tratamento do glioblastoma. Os *TKIs* estão sendo investigados por sua eficácia na inibição de vias de sinalização cruciais para a sobrevivência e proliferação das células tumorais, com ênfase em inibidores direcionados ao EGFR e outras quinases (Erasimus et al 2016; Louis et al., 2021).

Paralelamente, anticorpos monoclonais, como o bevacizumabe, estão sendo explorados para reduzir a angiogênese, enquanto anticorpos voltados para

mutações específicas da proteína EGFR, estão em diferentes fases de desenvolvimento clínico. Outras estratégias alvo-específicas incluem inibidores das vias PI3K/Akt/mTOR e terapias imunológicas, como inibidores de *checkpoint* imunológicos, que têm como objetivo melhorar a resposta imunológica contra o tumor. Esses estudos refletem um esforço contínuo para desenvolver tratamentos mais eficazes e personalizados para combater o glioblastoma (Erasimus et al 2016; Louis et al.,2021).

A resistência ao tratamento é um desafio crítico no manejo do glioblastoma, influenciada por fatores como a barreira hematoencefálica, a heterogeneidade celular do tumor e a presença de células-tronco tumorais, capazes de regenerar o tumor após a terapia (Stupp et al., 2005). O microambiente tumoral, composto por células imunes, endoteliais e componentes da matriz extracelular, também desempenha papel importante na progressão do tumor e na resistência aos tratamentos (Charlton et al., 2014).

A resistência do glioblastoma a tratamentos como quimioterapia e radioterapia é um desafio multifacetado, envolvendo diversos mecanismos biológicos. Entre os principais fatores responsáveis por essa resistência estão a superexpressão de proteínas que inibem a apoptose, como Bcl-2 e XIAP, que bloqueiam a morte celular programada, permitindo que as células tumorais sobrevivam mesmo diante de terapias agressivas. Além disso, a hipóxia intratumoral, caracterizada pela baixa oxigenação no microambiente do tumor, ativa vias de sinalização que promovem a sobrevivência das células cancerosas (Erasimus et al 2016; Louis et al.,2021).

Outro fator crítico é a angiogênese, o processo de formação de novos vasos sanguíneos, que fornece nutrientes e oxigênio ao tumor, contribuindo para sua resistência e crescimento. Alterações genéticas, como mutações no gene *TP53*, e a desregulação de vias de sinalização, como PI3K/Akt/mTOR, também desempenham papéis importantes na manutenção e na progressão do glioblastoma, tornando as células tumorais ainda mais resistentes ao tratamento (Erasimus et al 2016; Louis et al., 2021).

Além disso, a superexpressão de receptores de fatores de crescimento, como o EGFR, amplifica as vias de sinalização que promovem a proliferação celular e a resistência terapêutica. A presença de bombas de efluxo, como a P-glicoproteína, que remove quimioterápicos das células, reduz a eficácia dos tratamentos

farmacológicos. Por fim, a elevada capacidade de reparo de DNA nas células de glioblastoma contribui para a resistência à radioterapia, dificultando a indução de danos letais no DNA dessas células (Erasimus et al 2016; Louis et al.,2021).

A natureza invasiva e agressiva do GBM, combinada com a complexidade das cirurgias no sistema nervoso central, (Mallick et al., 2016) são fatores, que junto à curta sobrevida após o tratamento, ressaltam a urgência em desenvolver novas estratégias terapêuticas para o GBM.

Entender esses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam superar a resistência e melhorar os resultados clínicos em pacientes com glioblastoma.

2.2 Cultura de células

Modelos *in vitro* baseados em cultura de células têm sido amplamente utilizados para a triagem de novos fármacos, proporcionando economia de tempo e custos, aumento do número de repetições, miniaturização e automatização dos processos, além de minimizar as questões éticas associadas ao uso de modelos *in vivo* (Campos et al., 2018). Desde o estabelecimento do cultivo de células *in vitro* no final do século 20, muitos estudos farmacológicos e toxicológicos têm sido conduzidos utilizando esses modelos (Beissner et al., 2018). As células respondem aos efeitos de determinadas substâncias por meio de alterações em seu crescimento e metabolismo, além de mudanças na transcrição de genes que regulam suas funções básicas (Eisenbrand et al., 2002).

As culturas celulares *in vitro* podem ser obtidas utilizando diferentes tipos de células (Amellian et al., 2017). As culturas celulares primárias são derivadas de tecidos ou órgãos que são desagregados através de técnicas químicas, mecânicas ou enzimáticas (Hematian et al., 2016). No entanto, sua utilização apresenta algumas limitações, como alta variabilidade entre as culturas, reduzida capacidade proliferativa e maior tempo necessário para o cultivo (Martinovich et al., 2017). Em contrapartida, as linhagens celulares, que consistem em células imortalizadas, oferecem várias vantagens em relação às culturas primárias, como a capacidade de cultivo indefinido, produção de muitas células, minimização da variabilidade entre culturas, menor custo e melhor controle durante o cultivo (Gordon et al, 2013; Cuperlovic-Culf et al., 2010). Atualmente, mais de 4000 linhagens celulares,

provenientes de mais de 150 espécies, já foram estabelecidas para a triagem de novas moléculas (Yin et al., 2019). Dependendo da capacidade de adesão das células, tanto as culturas primárias quanto as linhagens celulares podem ser classificadas como aderentes, que têm a capacidade de se aderir a uma superfície específica, ou em suspensão, onde o cultivo é realizado sob agitação magnética para promover a circulação do meio de cultura e o crescimento celular (Amelian et al., 2017).

Embora o cultivo de células em monocamada (2D) seja o modelo *in vitro* mais amplamente utilizado devido à sua facilidade de manuseio, reprodutibilidade e baixo custo, ele não consegue reproduzir com precisão as propriedades dos tumores sólidos.

Por esse motivo, há um crescente interesse no desenvolvimento de métodos de cultivo de células que imitem de maneira mais fiel às características encontradas em tumores *in vivo*, especialmente para o estudo do comportamento de células tumorais em resposta a drogas anticâncer (Prestwich, 2008).

No início dos anos 1900, Harrison desenvolveu uma técnica para manter células de anfíbios vivas em laboratório. Anos depois, Alexis Carrel baseou-se no trabalho de Harrison para criar um líquido especial que prolongava a sobrevivência das células cardíacas da galinha. Ele observou que as células em maior contato com esse líquido sobreviviam melhor e, portanto, começou a cultivá-las em uma superfície de fios de seda para melhorar essa interação. Essa foi uma das primeiras tentativas de cultivo de células em três dimensões (3D). Na década de 1940, Johannes Holtfreter desenvolveu uma nova técnica de cultivo de células em 3D, utilizando ágar, uma substância extraída de algas marinhas, como base para evitar a adesão celular nas placas de cultivo, além de desenvolver um aparelho que permitia a rotação das culturas. A partir dos anos 1950, esse método de cultivo começou a ganhar popularidade entre os cientistas, e melhorias contínuas foram sendo implementadas (Amaral et al., 2011; Ferreira et al., 2018).

Embora o cultivo de células tradicionais em monocamada seja valioso para a compreensão de muitos processos biológicos, ele não consegue reproduzir adequadamente a organização e a proliferação celular características dos tumores. Ainda assim, é a forma mais utilizada para avaliar medicamentos anticâncer em laboratório (Costa et al., 2016). No cultivo em monocamada, as células apresentam uma morfologia bidimensional, estabelecendo predominantemente interações entre

a célula e o substrato da garrafa ou placa de cultivo, o que difere significativamente da organização tridimensional observada em tecidos e órgãos humanos, resultando em uma falta de mimetismo com o sistema fisiológico.

Como consequência, aspectos da biologia celular, como a produção de proteínas da matriz extracelular e de ancoragem, a expressão de genes importantes, a heterogeneidade tecidual e a atividade metabólica, são pouco representativas do que ocorre *in vivo* (Talukdar et al., 2011). Dessa forma, as culturas tridimensionais multicamadas (3D), também conhecidas como esferoides, têm ganhado destaque como uma ferramenta importante tanto na pesquisa básica quanto na aplicada (Wenzel et al., 2014), sendo o foco deste trabalho.

2.2.1 Cultura de células 2D

O estudo dos microambientes tumorais é crucial para entender o desenvolvimento e a progressão do câncer, além de avaliar a eficácia de substâncias naturais com potencial terapêutico. Tradicionalmente, os modelos de cultura de células bidimensionais (2D) têm sido amplamente utilizados para investigar o comportamento das células cancerosas e para testar agentes antitumorais (Huang et al., 2021). Contudo, esses modelos simplificados não conseguem replicar completamente a complexidade celular e o microambiente tridimensional (3D) presentes nos tumores *in vivo* (Jubelin et al., 2022).

A escolha adequada das condições de cultivo na pesquisa do câncer é fundamental para um entendimento mais profundo da biologia tumoral, o que pode contribuir para a otimização dos tratamentos de radioterapia e quimioterapia disponíveis, além de abrir caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Aggarwal et al., 2009).

Tradicionalmente, as células são cultivadas em ambiente estático em monocamadas (2D) em garrafas de cultura ou placas de Petri, sendo subcultivadas após atingirem a confluência para evitar a senescência celular ou a exaustão de nutrientes do meio de cultura (Breslin & O'driscoll, 2013). Os sistemas de cultivo de células 2D foram introduzidos inicialmente por Harrison em 1907, durante seus estudos sobre a origem das fibras nervosas (Harrison et al., 1907). Placas de 96 poços têm sido amplamente utilizadas em ensaios de toxicidade, mas placas de 384, 1536 e até 3456 poços foram desenvolvidas para reduzir os custos e o tempo

de cultivo, sendo aplicadas em plataformas de triagem de alto desempenho (*HTS - high throughput screening*) (Zhai et al., 2019).

Apesar de sua ampla aplicação e facilidade de uso, resultados discrepantes têm sido observados nos sistemas de cultivo de células 2D tradicionais quando comparados aos obtidos em modelos *in vivo*. Acredita-se que esses sistemas podem não refletir adequadamente o ambiente natural devido à ausência da organização tridimensional (3D) presente no tecido nativo, à interação limitada entre células e entre célula e matriz extracelular, à função tecidual específica restrita, além de diferenças na morfologia e polaridade celular. Essas limitações também podem resultar em alterações na expressão de receptores e fatores de crescimento, como o fator estimulante de colônia 1 (FEC-1), que induz os macrófagos a produzirem o fator de crescimento epidérmico (FCE), intimamente relacionado ao crescimento, migração e proliferação de células cancerosas (Yin et al., 2019; Xin et al., 2019; Breslin & O'driscoll, 2013).

Nas culturas 2D aderentes, as células crescem em monocamadas aderidas à superfície de um frasco de cultura (Breslin & O'driscoll, 2013). Esse tipo de cultivo é apreciado por sua simplicidade, baixo custo de manutenção e bom desempenho em testes funcionais. No entanto, ele apresenta desvantagens significativas, como a incapacidade de mimetizar adequadamente a arquitetura tridimensional dos tecidos ou tumores. Além disso, as interações célula-célula e célula-ambiente extracelular nesses modelos bidimensionais não refletem com precisão o microambiente tumoral encontrado *in vivo* (Kapalczyńska et al., 2018).

O isolamento de tecidos e a subsequente transferência para condições bidimensionais causam alterações significativas na morfologia tecidual e no padrão de divisão celular (Kapalczyńska et al., 2018). Essas mudanças afetam o acesso a nutrientes, oxigênio, metabólitos e moléculas sinalizadoras (Pampaloni et al., 2007), além de modificar a estrutura intracelular, a secreção, a sinalização e a função celular (Debnath; Brugge, 2005; Nelson et al., 2006). Essas alterações podem ainda induzir a perda de polaridade (Von der mark et al., 1977; Petersen et al., 1992; Mseka et al., 2007), impactando as respostas das células (Weaver et al., 2002; Meyers et al., 2006). Além disso, o cultivo bidimensional influencia a expressão gênica, o *splicing*, a topologia e a bioquímica celular (Gomez-lechón et al., 1998; Birgersdotter et al., 2005), normalmente limitando o estudo a um único tipo celular, o

que impede a formação de um microambiente tumoral diversificado com “nichos” celulares, como observado *in vivo* (Engler et al., 2006; Fischbachl et al., 2007).

Diante dessas limitações significativas dos modelos bidimensionais *in vitro*, surge a necessidade urgente de desenvolver modelos alternativos para o estudo do câncer. Recentemente, métodos de cultivo tridimensionais foram introduzidos, replicando características do crescimento celular *in vivo*, e possibilitando a auto-organização, diferenciação e heterogeneidade dentro do ambiente de cultura (Lacaster et al., 2013; Lancaster et al., 2014; Mccracken et al., 2014; Shamir et al., 2014).

2.2.2 Cultura de células 3D

Os sistemas de cultivo 3D têm sido amplamente estudados, pois são capazes de reproduzir diversas características do tecido nativo, como: (i) heterogeneidade celular; (ii) interação célula-célula e célula-matriz extracelular; (iii) sinalização célula-célula; (iv) perfil de expressão gênica; (v) estrutura interna com diferentes camadas; (vi) perfil de crescimento celular; e (vii) perfil de resistência a fármacos (Costa et al., 2016). Além de predizer de maneira mais fiel as características celulares *in vivo*, os sistemas de cultivo 3D devem idealmente garantir a reprodutibilidade a longo prazo por meio do controle do microambiente celular (incluindo parâmetros biológicos, físicos e químicos), além de oferecer facilidade de uso, baixo custo e um tempo de cultivo reduzido (Lemke et al., 2015).

Estima-se que, nos últimos 10 anos, aproximadamente 200 milhões de dólares tenham sido investidos em pesquisas envolvendo sistemas de cultivo de células 3D (Hartung;Thomas, 2014). Esses sistemas têm sido aplicados em diversas áreas, como estudos do câncer, desenvolvimento de fármacos, engenharia de tecidos e órgãos artificiais, devido à sua superior capacidade regenerativa, entre outras (KIM et al., 2019).

Os sistemas de cultivo de células 3D podem ser classificados em: (i) livres de *scaffolds*, que são formados apenas por células, sem o uso de suportes; (ii) baseados em *scaffolds*, nos quais as células são ancoradas ou encapsuladas em um biomaterial específico que simula a interação celular com componentes da matriz extracelular; (iii) híbridos, que combinam técnicas como micro e nanoencapsulação, unindo a agregação celular de abordagens livres de *scaffolds*

com a mimetização da matriz extracelular dos sistemas baseados em *scaffolds*; e (iv) sistemas microfluídicos, que utilizam dispositivos para recapitular o microambiente *in vivo* por meio da perfusão contínua de meio de cultura e comunicação celular (Ferreira et al, 2018; Roosens et al, 2017).

Nas técnicas que utilizam modelos com suporte, os esferoides são criados em estruturas artificiais compostas por polímeros ou outros materiais que imitam as condições da matriz extracelular (ECM). Embora essas técnicas possam ter um custo mais elevado, dependendo do material escolhido, elas fornecem suporte para o crescimento celular, permitindo que as células se desenvolvam em condições semelhantes às encontradas em tumores *in vivo* (Klamt et al.,2023).

Há diversos tipos de suportes disponíveis, como hidrogéis, por exemplo, Matrigel (Flores-Torres et al., 2021; Hongisto et al., 2013), suportes descelularizados (Koh et al., 2018), suportes fibrosos (Girard et al., 2013; Rabie et al., 2022), microesferas (Dhamecha et al., 2020; Pradhan et al., 2017) e suportes bioimpressos em 3D (Wu et al., 2016). A escolha do tipo de suporte depende da experiência do grupo de pesquisa na técnica de produção desejada.

Esses modelos de esferoides, frequentemente formados a partir de células cancerosas, utilizam células primárias derivadas de tumores ou de explantes tumorais e, em algumas abordagens, são cultivados em conjunto com outras células não cancerosas, como fibroblastos (Sutherland,R 1988; Kelm et al., 2003; Nagelkerke, 2013).

As células localizadas no núcleo do esferoide geralmente têm acesso limitado a nutrientes e oxigênio, gerando um gradiente de concentração desses elementos do centro para a periferia. Isso pode resultar na formação de diferentes camadas celulares dentro do esferoide, onde as células mais externas têm maior suprimento de nutrientes e oxigênio, enquanto as células mais internas podem estar em um estado de hipóxia (Mitrakas et al., 2023; Desmaison et al., 2018).

A estrutura tridimensional dos esferoides permite uma interação celular mais próxima, a formação de junções celulares e a expressão de genes e proteínas de maneira mais similar ao que ocorre no tecido *in vivo* (Tevlek et al., 2023; MA et al., 2023). Por isso, os esferoides são amplamente utilizados como modelos *in vitro* para estudar o comportamento celular, avaliar a eficácia de medicamentos e investigar processos biológicos complexos, como diferenciação e invasão celular (Pagnotta et al., 2022; Barbosa et al., 2021).

Essas estruturas 3D têm se mostrado ferramentas valiosas na pesquisa de novas substâncias farmacológicas, permitindo uma compreensão mais aprofundada dos processos celulares sob a ação desses compostos (Ipek et al., 2022).

Considerando a necessidade de aprofundar os estudos relacionados ao tratamento do glioblastoma e as evidências que apontam as culturas celulares 3D como ferramentas mais eficazes para replicar o ambiente tumoral, torna-se essencial investir em novas pesquisas que explorem esse modelo para o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar e caracterizar modelo *in vitro* de cultura tridimensional (3D) de células humanas tumorais de glioblastoma.

3.2 Objetivos específicos

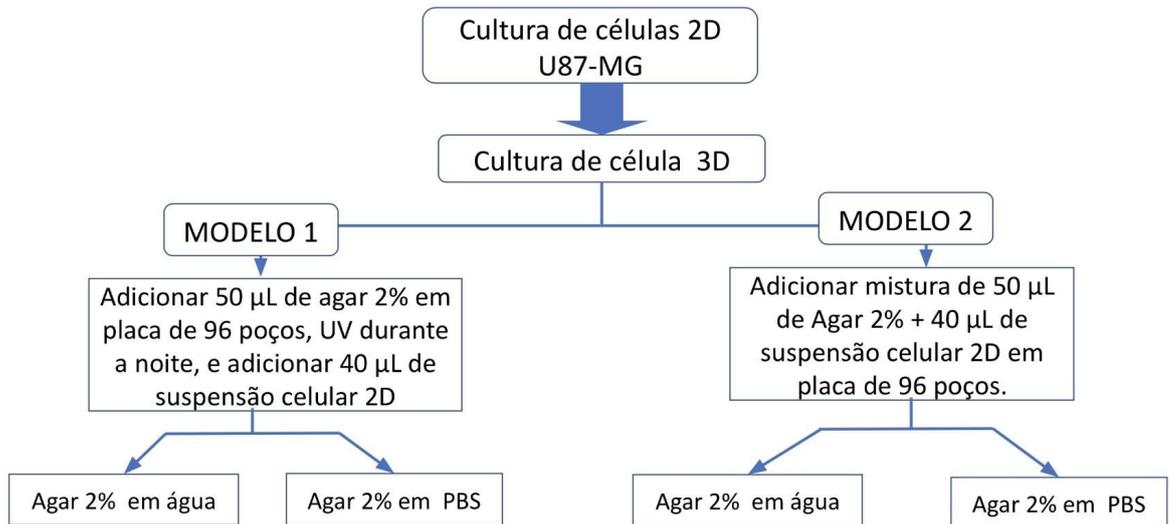
- Estabelecer as condições ideais e a estabilidade do modelo de cultura 3D;
- Caracterizar o modelo de cultura 3D quanto ao crescimento dos esferoides;
- Avaliar a viabilidade dos esferoides produzidos

4 METODOLOGIA

Foram realizados ensaios *in vitro* com as linhagens celulares de glioblastoma. U87-MG e T98G. A linhagem U87-MG foi originalmente cedida pelo Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI) pertencente à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), provenientes de um paciente homem de idade desconhecida (U-87 ATCC® HTB-14). As células da linhagem de glioblastoma T98G foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) provenientes de um paciente homem, caucasiano, de 61 anos (T98G ATCC® CRL 1690).

A seguir é apresentado um fluxograma representando a sequência dos experimentos realizados:

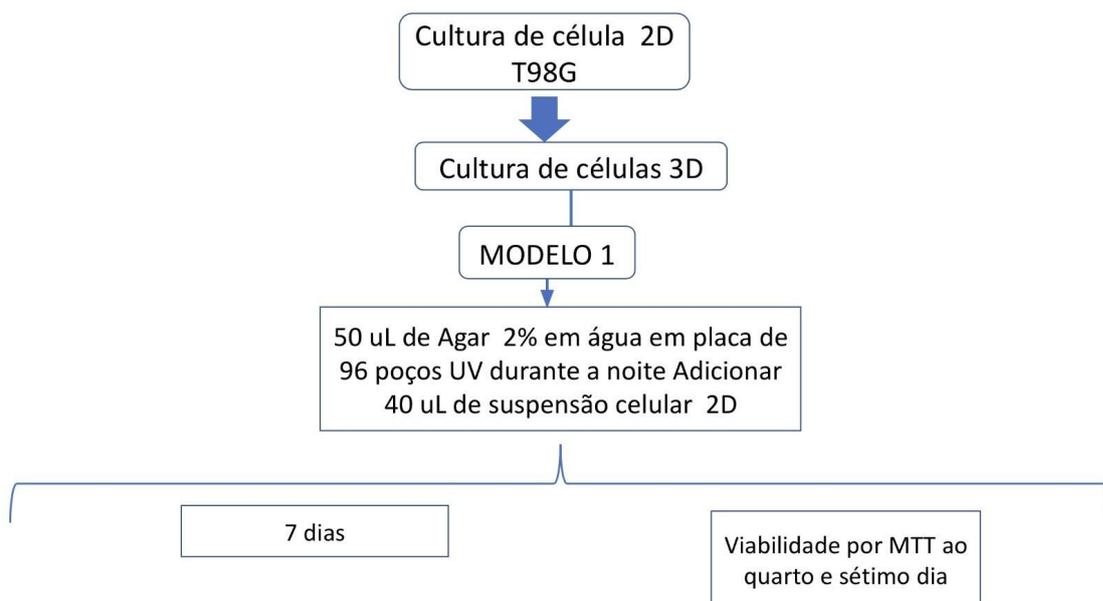
Figura 2 - Fluxograma da padronização dos métodos, utilizando a linhagem U87-MG



Legenda: PBS: Tampão fosfato-salino; UV: Ultravioleta, 2D: bidimensional; 3D: tridimensional.

Fonte: Autoria própria

Figura 3 - Fluxograma da caracterização dos esferoides, usando a linhagem T98G



Legenda: MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina; UV: Ultravioleta; 2D: bidimensional; 3D: tridimensional.

4.1 Cultura de células 2D

No cultivo em monocamada, as linhagens T98G e U87MG foram mantidas em meios de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células U87-MG foram cultivadas em RPMI 1640, suplementado com 20%(v/v) soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, 10-BIO500) (SBF) e 1% (v/v) penicilina/estreptomicina (LONZA, 21F095302). A T98G além desses componentes foi adicionada 1x de piruvato e 1x de aminoácidos não essenciais.

As células foram cultivadas em garrafas e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 2 dias (duas vezes por semana), de acordo com o crescimento celular.

Ao atingir 90% de confluência, as células foram recuperadas para o experimento. Para isso, o meio de cultura das garrafas foi desprezado e as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x, estéril. As células foram desprendidas da garrafa com o processo de dissociação enzimática com a solução de tripsina (0.25% tripsina/EDTA - Sigma Aldrich T4049).

Após inativação da tripsina por adição de meio de cultura, as células foram recuperadas e acondicionadas em tubo tipo Falcon de 15 ml, centrifugadas por 10 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de meio RPMI para a ressuspensão das células. Em seguida foi feita a contagem do número total de células viáveis na câmara de Neubauer. Empregou-se 190uL de corante azul de tripan mais 10 uL da suspensão de células.

Após a contagem e realização dos cálculos da concentração celular necessária para os experimentos, a suspensão de células foi utilizada para a padronização dos protocolos de cultivo celular 3D.

4.2 Cultura de células 3D

Inicialmente realizou-se a padronização do método para obtenção da cultura 3D, uma adaptação do método de Saleh, 2017. Para isso, utilizou-se as células 2D - U87-MG. Em seguida, preparou-se agarose 2% em água ou em PBS 1x, adicionou-se 50 µL da solução em placas de 96 poços, seguido de esterilização das placas na

luz UV por 16 horas. Posteriormente plaqueou-se 40 μL da suspensão de células nas concentrações $0,5 \times 10^4$, $1,2 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$ e $3,75 \times 10^4$ por poço. Acompanhou-se a formação dos esferoides por 4 dias, fotografando-os. Após a padronização do método, foi realizada a caracterização dos esferoides formados. Todos os procedimentos de crescimento e surgimento dos esferoides foram realizados com a linhagem de glioblastoma T98G. Essa linhagem foi utilizada para a caracterização, visto que o cultivo e a manutenção da cultura são mais fáceis e mais rápidos que a linhagem de células U87-MG. O crescimento dos esferoides foi feito utilizando agarose 2% em água, conforme descrito anteriormente. A cultura 3D foi acompanhada por 7 dias, fotografando os esferoides todos os dias, e foi avaliado a viabilidade no quarto e sétimo dia.

Após essa padronização, foi feita uma outra avaliação do preparo da agarose em meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), e seguido de esterilização por autoclavagem, sendo atualmente o método de escolha.

4.2.1 Caracterização dos esferoides

Durante todos os dias de incubação na estufa, após o plaqueamento, os poços foram fotografados, por um período de 7 dias, para verificar a formação de esferoides, avaliar os aspectos morfológicos, tamanho e quantidade de esferoides formados. O diâmetro de cada esferoide foi determinado com o auxílio do *software* de imagem (IMAGEJ) que é um software gratuito e de código aberto, amplamente utilizado para o processamento e análise de imagens em áreas como biologia, medicina e engenharia. Desenvolvido pelo National Institutes of Health (NIH), ele oferece uma gama diversificada de ferramentas para visualização, manipulação e quantificação de dados visuais, sendo personalizável para diferentes necessidades de pesquisa científica.

4.2.2 Viabilidade da cultura de células 3D

A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5- fenil brometo de tetrazolina). Após o quarto e sétimo dia de cultura adicionou-se 10 μL do reagente MTT em cada poço e incubou-se as placas na estufa 37°C por 4 horas. Após a incubação as placas foram centrifugadas por 3

minutos a 2000 rpm. Em seguida, foi removido o sobrenadante e foi adicionado 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, com incubação posterior das placas por 30 minutos. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplaca (ThermoFisher Multiskan FC 51119000), a partir da qual as médias para cada tratamento foram calculadas e subtraídas do branco.

4.2.3 Análise Gráfica

O *software* Excel foi usado para análise estatística da viabilidade. O Image J foi utilizado para a análise do diâmetro dos esferoides.

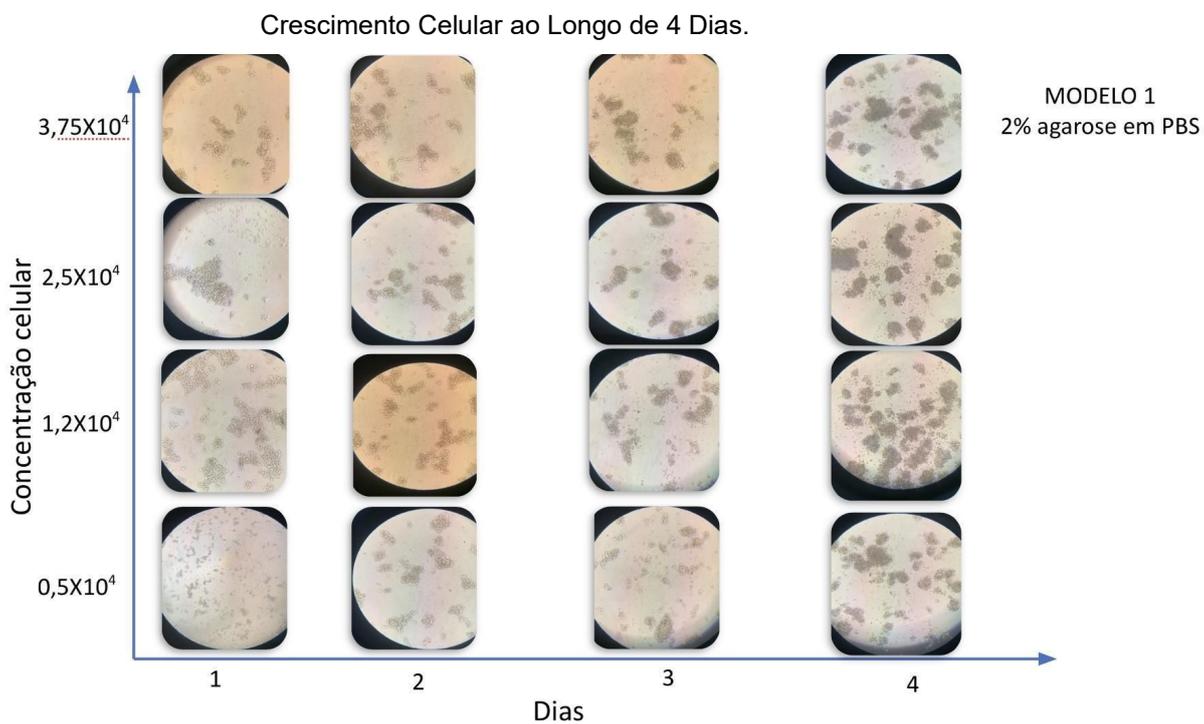
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de escolha utiliza a técnica conhecida como sobreposição líquida, que visa inibir a adesão das células à superfície do substrato onde estão cultivadas. A camada de gel de agarose não aderente permite que as células se agreguem e interajam entre si, promovendo a formação de esferoides tumorais multicelulares.

5.1 Padronização da cultura celular 3D

A figura 4 é uma representação do resultado do crescimento celular da cultura 3D padronizada com células cultivadas em um modelo tridimensional utilizando agarose a 2% em PBS. A imagem mostra a progressão do crescimento celular ao longo de quatro dias em diferentes concentrações celulares iniciais.

Figura 4 - Análise Temporal de Concentrações Celulares em Agarose 2% (PBS):



Cada célula na matriz de agarose é visualizada ao microscópio, e as imagens ao longo dos dias mostram o desenvolvimento das culturas celulares. É possível observar como as células se multiplicam e agregam-se ao longo do tempo nas diferentes concentrações iniciais.

Em culturas tridimensionais utilizando agarose a 2% em PBS, o resultado do crescimento celular varia conforme a concentração inicial de células. Em concentrações menores, o crescimento é mais lento devido ao maior espaço entre as células, o que afeta a formação de esferoides. Em concentrações mais altas, os esferoides se formam mais rapidamente, favorecidos pela maior proximidade celular, que intensifica a comunicação e a agregação. Esse modelo oferece uma plataforma eficiente para estudar a organização e o crescimento celular em condições que imitam o microambiente tumoral, permitindo a análise do impacto da densidade celular inicial sem interferência externa no comportamento das células (Friedrich et al., 2009; Ivascu et al., 2006; Vinci et al., 2012).

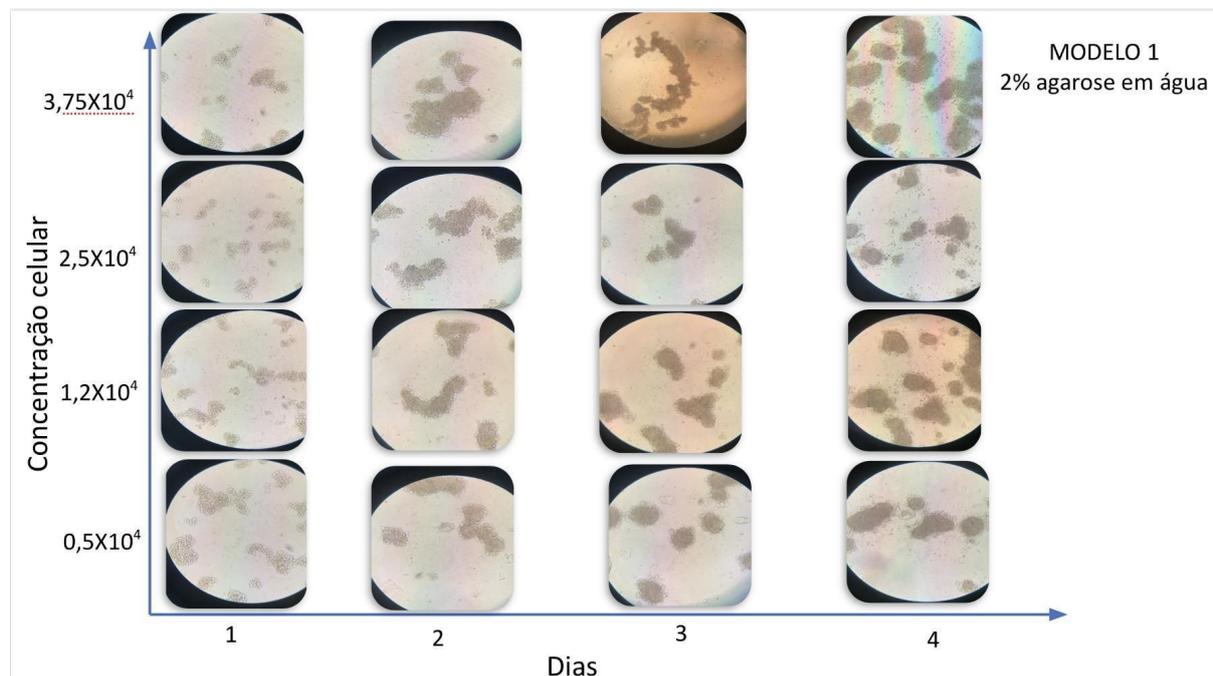
Os resultados indicam que a concentração celular inicial tem um papel crucial na velocidade de formação e na morfologia dos esferoides. Em concentrações mais altas, a formação de esferoides ocorre de maneira mais rápida e compacta,

enquanto concentrações mais baixas resultam em um crescimento celular mais disperso.

A figura 5 é uma representação do resultado do crescimento celular da cultura 3D padronizada com células cultivadas em um modelo tridimensional utilizando agarose a 2% em água. A imagem mostra a progressão do crescimento celular ao longo de quatro dias em diferentes concentrações celulares iniciais.

Figura 5 - Análise Temporal de Concentrações Celulares em Agarose 2% (Água):

Crescimento Celular ao Longo de 4 Dias.



Fonte: Autoria própria

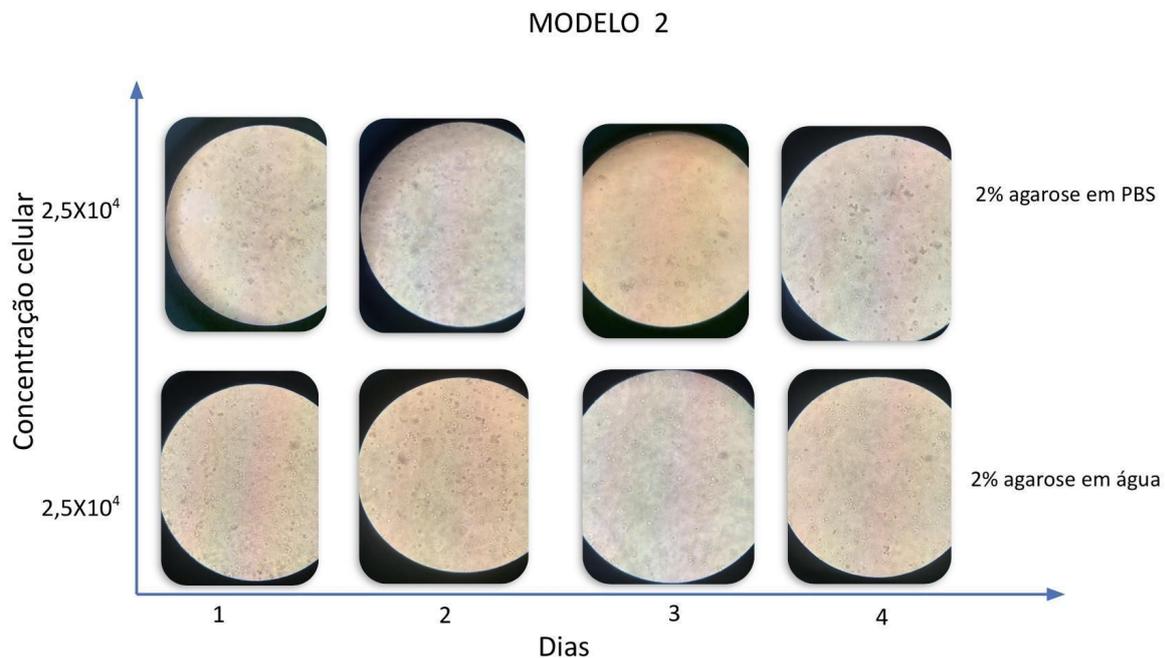
As culturas celulares foram observadas ao longo de quatro dias em diferentes concentrações iniciais. As imagens mostram como as células se comportam em termos de agregação e formação de esferoides ao longo do tempo, nas diferentes concentrações iniciais. À medida que os dias passam, as células começam a se agrupar e formar esferoides visíveis, especialmente nas concentrações mais altas, sendo que a estrutura e a densidade dos esferoides variam de acordo com a concentração inicial de células e o tempo de incubação.

Neste modelo pode-se observar que os esferoides formados se encontram mais compactados, com morfologia mais definida e passou a ser o modelo utilizado para os demais experimentos. O uso de água pode ser interessante para

comparações, pois as esferas formadas apresentaram uma melhor estrutura, além de a manipulação da agarose ter sido mais fácil nesse meio. Conforme Frey et al . (2015) em seu estudo encontrou resultados semelhantes, onde esferoides mais compactados apresentam melhor estrutura e resposta a drogas, reforçando a ideia de que o meio de formação e a compactação influenciam diretamente a qualidade dos esferoides e facilitam sua manipulação.

Também foram realizados ensaios utilizando o modelo 2, onde a suspensão de células foi colocada junto com a solução de agarose 2% diluída em PBS ou água antes da solidificação da agarose. A figura 6 mostra que esse modelo não foi eficiente visto que não foi observado a formação de esferoides em nenhum poço avaliado, independente da concentração de células ou da diluição da agarose em PBS ou água. Isto ocorreu, provavelmente devido à dispersão celular na matriz de agarose, o que dificultou as interações necessárias para a agregação celular.

Figura 6 - Comparação do Crescimento Celular entre Agarose 2% em PBS e Agarose 2% em Água ao Longo de 4 Dias (Modelo 2)



Fonte: Autoria própria

O modelo 1 demonstrou ser mais eficiente, pois a agarose é solidificada antes da adição da suspensão de células, favorecendo a migração e interação celular, resultando na formação de esferoides. A principal diferença entre os modelos está na técnica de preparo, com o modelo 1 proporcionando um ambiente mais adequado para a formação de esferoides tridimensionais.

No modelo 2, em que foi realizada a mistura de agarose com a suspensão de células, não houve formação de esferoides durante os quatro dias de observação. Isso sugere que esse método, no qual a agarose e as células são solidificadas em conjunto, não proporciona as condições ideais para a formação de esferoides. A razão provável é que as células ficam dispersas de maneira difusa na matriz de agarose, o que impede a interação célula-célula necessária para o agrupamento e compactação adequados para a formação dos esferoides.

Por outro lado, o modelo experimental 1, que consiste na adição de agarose seguida pela adição da suspensão de células após a solidificação da matriz, utiliza uma metodologia distinta. Nesse método, a agarose é solidificada primeiro, e então a suspensão de células é aplicada sobre essa superfície sólida. Essa abordagem favorece a migração e agregação celular, promovendo a formação de esferoides. Esse método se mostra mais eficaz para a formação de esferoides, pois permite que as células interajam entre si sem serem imobilizadas pela matriz de agarose. Assim, a escolha do modelo experimental 1 é justificada como uma abordagem mais eficiente para a formação de esferoides. Além disso, esse método reduz a dispersão celular, facilitando a compactação e as interações célula-célula, essenciais para o crescimento tridimensional típico dos esferoides, esses achados também foram observados por Friedrich et al. (2009)

Em ambos os modelos, observou-se o crescimento celular por 4 dias, embora o plano original fosse estender o experimento para 7 dias. No entanto, ocorreu perda significativa das células após a troca de meio. Com base nisso, padronizamos o procedimento sem a troca de meio no 4º dia, conforme sugerido por Silva et al. (2020), que recomendam evitar a troca de meio em culturas tridimensionais para minimizar o estresse celular e a perda de viabilidade.

A estrutura da agarose manteve-se estável em ambos solventes (PBS ou água), oferecendo suporte adequado para o crescimento celular tridimensional. A rigidez da matriz, um fator que afeta a proliferação celular, não foi influenciada pela substituição de PBS por água (Drury; Mooney, 2003). A agarose mostrou-se eficiente como matriz tridimensional, útil especialmente para o estudo de tumores sólidos como o glioblastoma, simulando melhor o microambiente tumoral *in vivo* (Pampaloni et al., 2007).

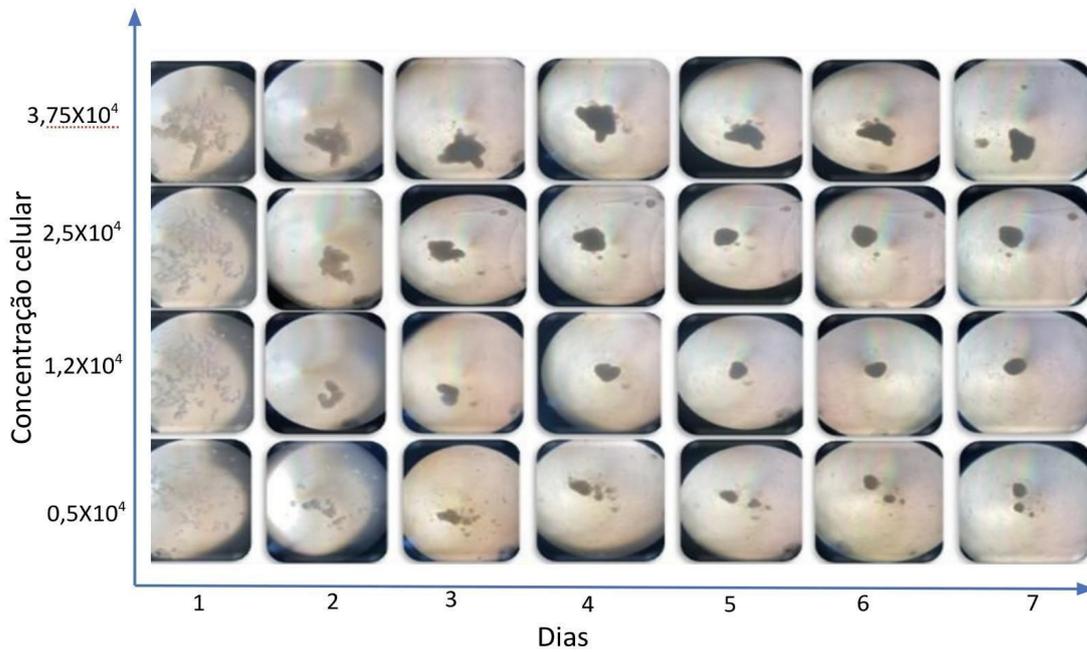
5.2 Caracterização da cultura de células 3D

A caracterização dos esferoides é de suma importância para garantir esferoides com diâmetro homogêneo, fator essencial para a padronização e reprodutibilidade dos resultados experimentais. A uniformidade dos esferoides cria condições mais controladas para a avaliação de respostas a diferentes terapias, pois variações no tamanho dos esferoides podem impactar diretamente a penetração de fármacos e a resposta celular. Dessa forma, a homogeneidade no tamanho dos esferoides facilita comparações entre diferentes grupos experimentais e aumenta a precisão nas análises de viabilidade celular, morte programada e proliferação após a aplicação dos tratamentos (Fredrich et al., 2009).

5.2.1 Avaliação do diâmetro dos esferoides

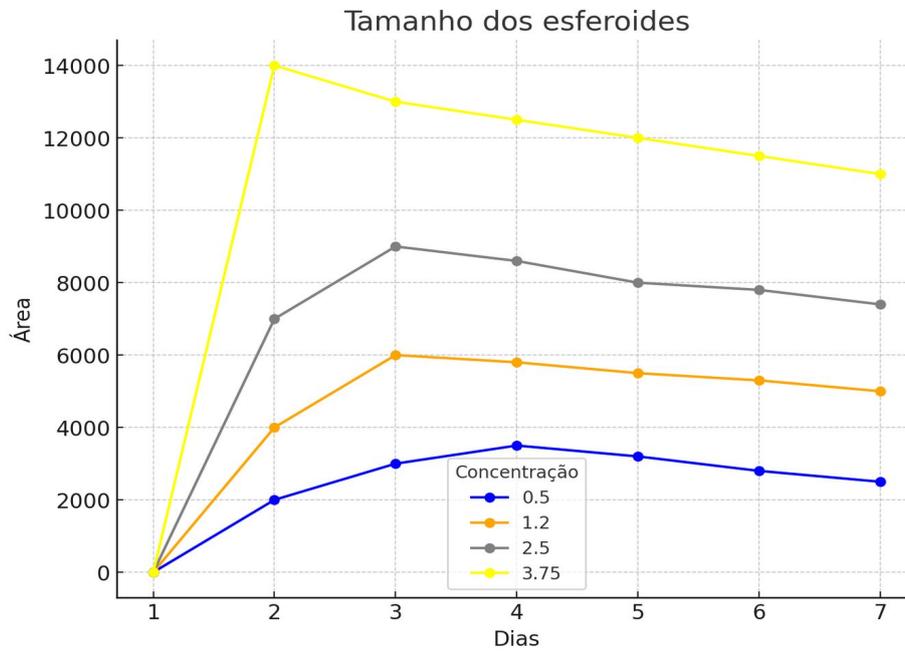
A mensuração do diâmetro dos esferoides em culturas tridimensionais é amplamente utilizada para monitorar o crescimento e a viabilidade celular em estudos de tumores. Esse parâmetro fornece informações sobre a proliferação celular e a resposta a tratamentos, como drogas quimioterápicas (Fischbach et al., 2007). Conforme Souza et al. (2019), o aumento do diâmetro dos esferoides está associado à maior resistência terapêutica, devido à formação de gradientes de oxigênio e nutrientes, resultando em hipóxia e necrose central. A medição do diâmetro é feita com o auxílio de microscopia e *softwares* de análise de imagem, garantindo precisão e padronização. Para a avaliação do diâmetro dos esferoides foi utilizado a linhagem T98G (modelo 1 – agarose diluída em água) que foi selecionada para caracterizar os experimentos laboratoriais devido à sua facilidade de manipulação. Sua praticidade e rápida execução nos processos tornam os experimentos mais ágeis, permitindo maior eficiência e economia de tempo para os pesquisadores. Essas qualidades, combinadas com sua robustez em análises, fazem da T98G uma escolha preferencial para o estudo, especialmente quando a otimização dos procedimentos laboratoriais é essencial. A figura 7 mostra painel com as imagens das células em diferentes concentrações por um período de 7 dias. Após a análise do diâmetro dos esferoides pelo Image J foi plotado gráfico do tamanho dos esferoides encontrados de acordo com a concentração de células.

Figura 7 - Avaliação do crescimento de esferoides celulares em um meio ao longo de sete dias, em diferentes concentrações iniciais de células.



Fonte: Autoria própria

Figura 8 - Variação do tamanho dos esferoides (em área) ao longo de 7 dias em diferentes concentrações celulares iniciais.



Fonte: Autoria própria

Os resultados ao longo de 7 dias mostram uma correlação direta entre a concentração inicial de células e o tamanho dos esferoides formados. Concentrações mais altas ($3,75 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$) resultaram em esferoides maiores, principalmente nos primeiros dias, enquanto concentrações menores ($1,2 \times 10^4$ e $0,5 \times 10^4$) mostraram um crescimento menos acentuado.

O crescimento e o tamanho dos esferoides ao longo do tempo, conforme ilustrado na imagem, estão diretamente relacionados à concentração inicial de células e ao processo de agregação e compactação celular que ocorre durante a formação dos esferoides. No início do experimento, esferoides maiores são formados em concentrações celulares mais elevadas, como observado na linha superior, com uma concentração de $3,75 \times 10^4$ células. No entanto, ao longo dos dias, nota-se uma diminuição no tamanho dos esferoides, atribuída à compactação celular e à organização interna das células, o que resulta na formação de esferoides mais densos.

O comportamento dos esferoides em função do tempo pode ser influenciado por diversos fatores, tais como a disponibilidade de nutrientes, o acúmulo de resíduos metabólicos e a interação célula-célula. Esse processo de compactação resulta, em geral, na redução do diâmetro dos esferoides com o passar do tempo, conforme mostrado a partir do quarto dia. Estudos indicam que o aumento da densidade celular no interior dos esferoides pode reduzir a proliferação celular nas camadas mais internas devido à hipóxia e à limitação de nutrientes, o que contribui para a diminuição progressiva do diâmetro dos esferoides (Friedrich et al., 2009).

Foi observado que o esferoide formado na cultura 3D não apresenta uma diferença expressiva de tamanho entre o quarto e o sétimo dia de cultivo. Isso indica que a forma final desses esferoides se estabelece por volta do quarto dia de cultura. Esse comportamento sugere que, a partir do quarto dia, as células atingem um estado de equilíbrio, onde a compactação e a organização celular estão consolidadas, resultando em uma estrutura estável.

A escolha do quarto dia como ponto ideal para as análises é justificada pela observação de que, nesse estágio, o esferoide já alcança um tamanho homogêneo, garantindo maior reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, esse período minimiza o risco de contaminação e previne o esgotamento dos nutrientes no meio de cultura, o que poderia comprometer a viabilidade celular e influenciar negativamente os resultados. Dessa forma, a análise realizada até o quarto dia é

suficiente para obter esferoides com tamanho uniforme, além de reduzir as chances de perda de viabilidade celular e problemas relacionados à nutrição e contaminação.

Estudos indicam que densidades celulares mais altas facilitam a agregação e a proliferação mais rápida nas fases iniciais (Pampaloni et al ., 2007).

Durante a formação dos esferoides, fatores metabólicos, como a oxigenação, influenciam diretamente seu crescimento e tamanho (Fischbah et al.,2007). Um estudo de 1986 já demonstrava que a taxa de consumo de oxigênio e glicose nos esferoides está diretamente ligada ao volume celular, o qual diminui conforme as células entram em um estado de não-proliferação, resultando no aumento da área necrótica (Mueller-klieser, 1986).

Esferóides maiores, formados a partir de concentrações celulares mais altas, reproduzem melhor o microambiente tumoral *in vivo*, incluindo zonas hipóxicas e necrose central, sendo adequados para estudos de resposta a terapias anticâncer. Em contrapartida, esferoides menores, formados em concentrações mais baixas, são mais adequados para estudos de proliferação celular, sem as limitações impostas pela hipóxia (Griffith;Sartz, 2006). Ambas as formas são valiosas para pesquisas oncológicas.

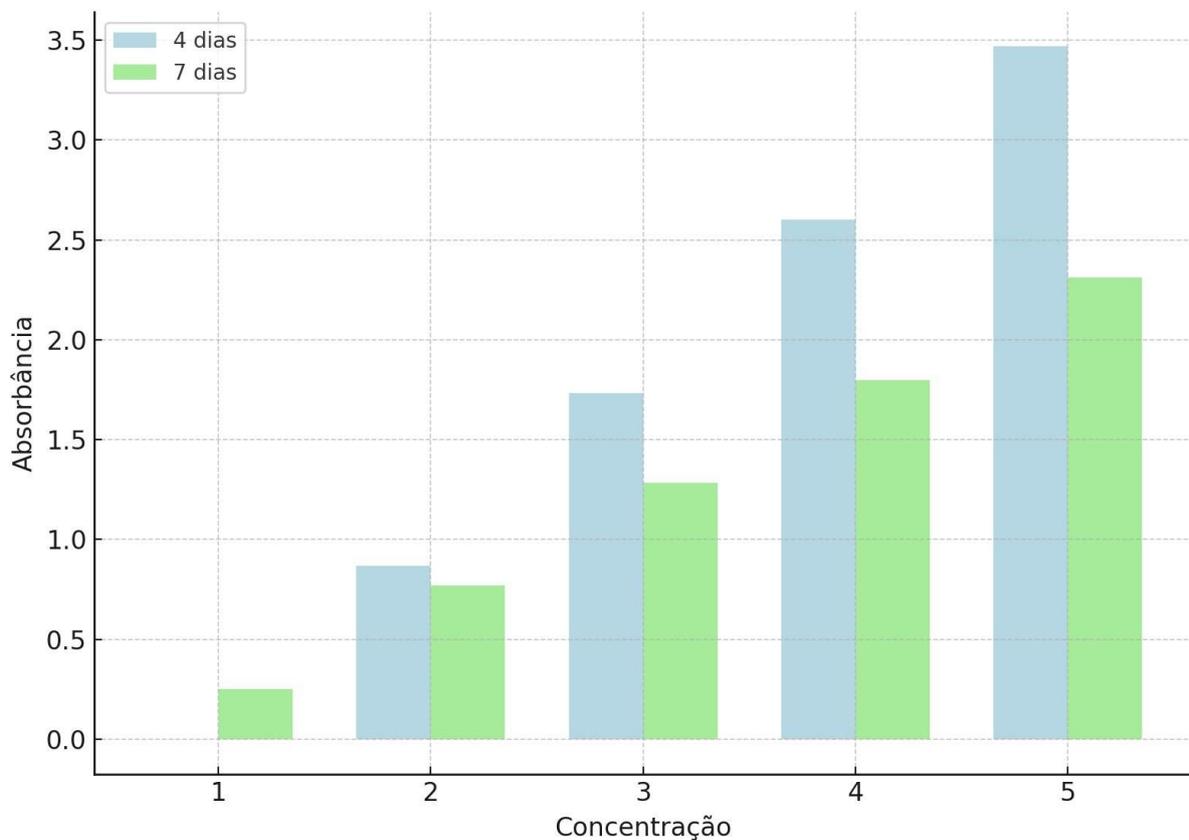
O encolhimento das áreas dos esferoides parece estar associado à sua compactação, e não a uma diminuição real, considerando que seria esperado um aumento na proliferação celular ao longo de sete dias. Esse fenômeno já foi descrito em estudos anteriores, como o de Dal Mora (2018), que identificou uma redução no diâmetro dos esferoides cultivados em meio normal, sem estímulos ou tratamentos, evidenciando uma tendência à compactação com o passar do tempo.

Uma das principais distinções entre culturas celulares 3D e 2D está na morfologia das células. Em culturas 2D, as células se expandem horizontalmente devido à falta de suporte para o crescimento vertical, o que altera sua polaridade, afetando processos como proliferação, diferenciação e sensibilidade à apoptose. A geometria celular (como circular vs. estrelada ou alongada vs. cuboide) impacta tanto a função celular quanto a área de crescimento em 2D. Embora o efeito dessas características no modelo 3D ainda não seja completamente elucidado, acredita-se que elas desempenhem um papel importante no padrão de crescimento e na adesão entre as células (Baker, 2012).

5.2.2 Avaliação da viabilidade celular 3D

A figura 8 mostra que, à medida que a concentração celular inicial aumenta, a viabilidade dos esferoides também tende a aumentar tanto no 4º quanto no 7º dia. No entanto, a inclinação da linha de tendência no 7º dia é menor do que no 4º dia, o que pode indicar uma diminuição na taxa de crescimento ou na viabilidade celular ao longo do tempo, possivelmente devido ao aumento da densidade celular e à competição por recursos dentro dos esferoides.

Figura 9 - Comparação da absorvância de esferoides em diferentes concentrações no 4º e 7º dia de cultivo.



Fonte: Autoria própria

No 4º dia, observou-se uma forte correlação positiva, indicando que a viabilidade dos esferoides aumentou proporcionalmente à concentração celular. Esse comportamento é característico dos estágios iniciais de formação de esferoides, quando a maior densidade celular favorece a agregação e a

proliferação, conforme apontado por Fischbach et al. (2007), que destacou a relação entre densidade celular e viabilidade em culturas tridimensionais.

Já no gráfico do 7º dia, percebe-se uma desaceleração no crescimento da viabilidade, sugerindo que, em estágios mais avançados, os esferoides enfrentam desafios no microambiente, como a limitação de nutrientes e oxigênio, além da possível formação de regiões necróticas no centro dos esferoides. Segundo Mueller-Klieser (1986), conforme os esferoides aumentam de tamanho, há uma maior tendência ao surgimento de áreas necróticas, o que reduz a viabilidade, especialmente nas regiões mais internas.

O ensaio MTT demonstrou que a viabilidade dos esferoides é altamente influenciada pela concentração celular nos estágios iniciais de cultura. No entanto, conforme os esferoides aumentam de tamanho, o microambiente se torna menos favorável, devido à limitação de oxigênio e nutrientes, o que pode prejudicar a viabilidade celular, principalmente nas camadas internas. Esses achados estão em conformidade com a literatura, que relata a correlação entre o crescimento dos esferoides, a disponibilidade de recursos e a viabilidade das células (Mueller-Klieser, 1986; Fischbach, 2007).

As culturas tridimensionais permitem que as células cresçam e interajam em todas as direções, formando esferoides, o que cria um ambiente celular mais próximo do fisiológico, simulando melhor o microambiente tecidual. Nos esferoides 3D, como mostrado nos gráficos de viabilidade dos dias 4 e 7, as células têm maior interação tridimensional, favorecendo uma morfologia mais natural. No entanto, em concentrações celulares elevadas, especialmente após vários dias de crescimento, surgem limitações no fornecimento de oxigênio e nutrientes, resultando em zonas hipóxicas e necróticas no centro dos esferoides (Griffith; Swartz, 2006), o que explica a redução de viabilidade observada no 7º dia.

6. CONCLUSÃO

Os achados encontrados neste trabalho mostraram que a concentração inicial de células de glioblastoma afeta diretamente o tamanho e a viabilidade dos esferoides, com esferoides maiores formados em concentrações mais elevadas de células. O tempo é um fator limitante para o crescimento adequado dos esferoides, sendo o 4º dia de cultivo o melhor período para a formação de esferoides com

tamanho e morfologia homogêneos e viabilidade de células elevado. O modelo proposto neste trabalho poderá ser utilizado para estudos futuros na área de desenvolvimento de novos fármacos utilizando modelo tridimensional de células de glioblastoma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agani, C. A. J. **O. Estabelecimento de linhagem de glioblastoma humano resistente ao quimioterápico temozolomida.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/206854>>. Acesso em: 5 ago. 2024.

AGGARWAL, B. B.; et al. **Role of cancer cell culture in drug discovery and development: advantages and limitations.** Biochemical Pharmacology, v. 77, n. 3, p. 403-420, 2009.

AGNIHOTRI, S. et al. **Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies.** Archives of Immunology and Therapy Experimental, v. 61, p. 25-41, 2013.

AGRAWAL, V.; et al. **3D cell culture in tissue engineering and cancer research.** Journal of Cellular Physiology, v. 236, n. 4, p. 2414-2430, 2021.

ANDREWS, L. J., et al. **Pre-diagnostic blood biomarkers for adult glioma.** Frontiers in Oncology, v. 13, 2023.

AMARAL, L.; FERREIRA, P. **Evolução dos métodos de cultivo celular tridimensional ao longo do tempo.** Journal of Biomedical Research, v. 15, n. 3, p. 245-258, 2011.

AMELIAN, A.; et al. **Cell culture models in cancer research and drug discovery.** Biomedical Research International, v. 2017, p. 1-12, 2017.

BADER, J. E.; et al. **Tumor metabolism and its unique properties in cancer progression.** Trends in Cell Biology, v. 30, n. 2, p. 153-166, 2020.

BAKER, Brendon M.; CHEN, Christopher S. **Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues.** J Cell Sci, v. 125, n. 13, p. 3015-3024, 2012.

BALANDEH, E.; MOHAMMADSHAFIE, K.; MAHMOUDI, Y. et al. **Roles of Non-coding RNAs and Angiogenesis in Glioblastoma.** Frontiers in Cell and Developmental Biology, v. 9, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.716462/full> . Acesso em: 1 set. 2024.

BAO, S. et al. **Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.** Nature, v. 444, p. 756-760, 2006.

BARBOSA, A. M.; et al. **In vitro 3D models as predictive tools for breast cancer progression.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, v. 1868, n. 1, p. 118895, 2021.

BEISSNER, N.; et al. **Evaluation of new therapeutic approaches in in vitro models of cancer drug resistance**. *Biochemical Pharmacology*, v. 158, p. 263-273, 2018.

BENAM, K. H.; et al. **Engineered in vitro disease models**. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 14, p. 379-408, 2019.

BMC Cancer. **Comparative transcriptome analysis of matched primary and distant metastatic ovarian carcinoma**. *BMC Cancer*, v. 23, n. 15, p. 64, 2023

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. **Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery**. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.

BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL. **Researchers design gene therapy that can effectively target glioblastoma**. *ScienceDaily*, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedaily.com/releases/2023/10/231018115605.htm>. Acesso em: 10 out. 2024.

CAMPBELL, L. G. et al. **Clinical presentation of glioblastoma multiforme**. *Brain Pathology*, v. 22, n. 2, p. 204-210, 2012.

CAMPOS, A.; et al. **In vitro models for drug screening and toxicity assessment**. *Journal of Biomedical Science*, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2018.

CHARLTON, J. F.; WHELAN, C. J.; ROBINS, P. A. **Tumor microenvironment in glioblastoma multiforme**. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 119, n. 3, p. 653-662, 2014.

CHERAY, M. et al. **Glioma stem cells, principles and mechanisms**. *Journal of Oncology*, v. 2017, 2017.

COSTA, E. C.; et al. **3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis**. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 8, p. 1427-1441, 2016.

COSTA, João P.; ALMEIDA, Beatriz F.; SOUZA, Mariana L. **Avaliação da viabilidade celular em modelos tridimensionais: aplicações e desafios**. *Journal of Cellular Research*, v. 32, n. 4, p. 250-265, 2020.

CUPERLOVIC-CULF, M.; et al. **Machine learning and data mining in chemoinformatics and bioinformatics**. *Current Computer-Aided Drug Design*, v. 6, n. 1, p. 11-25, 2010.

DAL MORA, Tamara et al. **Estabelecimento de esferoides multicelulares tipo tecido adiposo: aspectos morfo-funcionais da adipogênese**. 2018.

DEBNATH, J.; BRUGGE, J. S. **Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures**. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 9, p. 675-688, 2005.

DE MEJIA, E.; RODRIGUEZ, M.; TORRES, V. **Características das neoplasias benignas e prognóstico**. *Estudos Clínicos em Oncologia*, v. 20, n. 3, p. 89-97, 2003.

DESMAISON, A.; et al. **Hypoxia in spheroids: A feature or a bug? A bioengineering perspective**. *Bioengineering*, v. 5, n. 3, p. 55, 2018.

DHAMECHA, D.; et al. **Nanoparticle-mediated drug delivery for the treatment of cancer: Focus on recent advances and challenges**. *Journal of Controlled Release*, v. 324, p. 41-54, 2020.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. **Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications.** *Biomaterials*, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, 2003.

EISENBRAND, G.; et al. **Use of cell cultures for toxicology and pharmacology studies.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, n. 2-3, p. 193-212, 2002.

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. **A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 1, p. 59-74, 2011.

ENGLER, A. J.; et al. **Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.** *Cell*, v. 126, n. 4, p. 677-689, 2006.

FISCHBACH, C.; et al. **Engineering tumors with 3D scaffolds.** *Nature Methods*, v. 4, n. 10, p. 855-860, 2007.

ERASIMUS, H. et al. **DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 769, p. 19-35, 2016. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.05.002.

FERNANDES, R. T. et al.. **The 2021 World Health Organization classification of gliomas: an imaging approach.** *Radiologia Brasileira*, v. 56, n. 3, p. 157–161, maio 2023. Disponível em :<https://www.scielo.br/j/rb/a/mxMcqCLRF7zLXG7KwWwGM6w/?lang=pt#:~:text=Os%20astrocitomas%2C%20IDH%2Dmutados%2C,nas%20seqüências%20ponderadas%20em%20T2>. Acesso em : 02 de setembro de 2024

FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. **Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects.** *Acta Biomaterialia*, v. 75, p. 11-34, 2018.

FERREIRA, P. C. G.; et al. **Evolution of 3D cell culture technologies to mimic cell function and structure.** *Journal of Cell Science*, v. 131, n. 1, p. jcs213702, 2018.

FISCHBACH, C. et al. **Cancer cell angiogenic capability versus endothelial cell susceptibility to anti-angiogenic therapy: A complex balance.** *Nature Reviews Cancer*, v. 7, p. 450–460, 2007.

FISCHBACH, C.; et al. **Engineering tumors with 3D scaffolds.** *Nature Methods*, v. 4, n. 10, p. 855-860, 2007.

FLORES-TORRES, S.; et al. **Matrigel as a key component of multicellular models for the study of cancer.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 613380, 2021.

FREY, Oliver et al. **Compact tumor spheroids with tightly regulated growth show superior drug response in comparison to loosely packed spheroids.** *Journal of Cell Science*, v. 128, n. 3, p. 311-322, 2015.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. **Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach.** *Nature Protocols*, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2008.226.

FRIEDRICH, J.; et al. **Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach.** *Nature Protocols*, v. 4, n. 3, p. 309-324, 2009.

FRONTIERS. **What predicts survival in glioblastoma?** *Frontiers in Oncology*, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.12234/full>. Acesso em: 25 jun . 2024.

- FURNARI, Frank B. et al. **Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment.** *Genes & Development*, v. 21, n. 21, p. 2683-2710, 2007.
- GALLEGO, O. **Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma.** *Curr Oncol.*, v. 22, n. 4, p. e273-e281, ago. 2015. doi: 10.3747/co.22.2436. PMID: 26300678; PMCID: PMC4530825.
- GIRARD, Y. K.; et al. **A 3D fibrous scaffold inducing tumor-like structures and EMT phenotypes for the study of breast cancer therapies.** *Biomaterials*, v. 34, n. 29, p. 6987-6998, 2013.
- GOMEZ-LECHÓN, M. J.; et al. **Culture of human hepatocytes on soft collagen: structural and functional characterization of the differentiated and polarized cells.** *Hepatology*, v. 28, n. 3, p. 656-665, 1998.
- GORDON, R.; AMINI, S.; WHITE, L. A. **Cell culture models and applications for drug screening and cell-based therapies.** *Cell Culture Techniques and Applications*, v. 1, p. 1-17, 2013.
- GRIFFITH, L. G.; SWARTZ, M. A. **Capturing complex 3D tissue physiology in vitro.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 3, p. 211-224, 2006.
- GUNTI, S.; et al. **Development and applications of tumor spheroids and organoids as 3D in vitro cancer models.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11885, 2021.
- HAQUE, R. et al. **Glioblastoma outcomes in the National Cancer Database: an update.** *Journal of Neuro-Oncology*, 2022.
- HARRISON, R. G.; et al. **Observations on the living developing nerve fiber.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 4, p. 140-143, 1907.
- HARTUNG, T. **Toxicology for the twenty-first century.** *Nature*, v. 460, n. 7252, p. 208-212, 2014.
- HEMATIAN, M.; et al. **Techniques for dissociation of human tissues to obtain cell cultures.** *Methods in Molecular Biology*, v. 1516, p. 1-15, 2016.
- HEREDIA-MENDEZ, R.; et al. **Recent advances in 3D cell culture models for cancer research and drug screening applications.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 11, p. 1157469, 2023.
- HERTLER, C. et al. **Long-term survival with IDH wildtype glioblastoma: first results from the ETERNITY Brain Tumor Funders' Collaborative Consortium (EORTC 1419).** *European Journal of Cancer*, v. 186, p. 69-77, 2023.
- HONGISTO, V.; et al. **High-throughput 3D screening reveals differences in drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells.** *PloS One*, v. 8, n. 10, p. e77232, 2013.
- HUANG, L.; et al. **Modelos de cultura celular bidimensionais (2D) para investigação do comportamento das células cancerígenas e teste de agentes antitumorais.** *Cancer Research*, v. 81, n. 15, p. 4056-4065, 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report 2014**. 1. ed. Genebra: World Health Organization, 2014. 512 p. ISBN 978-9283204299.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer** : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro : INCA, 2020.

IPEK, M.; et al. **Impact of the 3D microenvironment on cellular response to drug treatment**. Journal of Biotechnology, v. 325, p. 12-23, 2022.

IVASCU, A.; KUBBIES, M. **Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis**. Journal of Biomolecular Screening, v. 11, n. 8, p. 922–932, 2006. DOI: 10.1177/1087057106292763.

JUBELIN, C.; et al. **3D tumor models: Recent developments and future challenges in drug development**. Pharmacology & Therapeutics, v. 236, p. 108113, 2022.

JUBELIN, C.; et al. **Modelos tridimensionais (3D) no estudo do microambiente tumoral**. Journal of Cellular Biochemistry, v. 123, n. 6, p. 1200-1211, 2022.

KARGER. **Glioblastoma multiforme: The latest diagnostics and treatment techniques**. **Pharmacology**, 2023. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/526423>. Acesso em: 10 out. 2024.

KAPALCZYNSKA, M.; et al. **2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures**. Archives of Medical Science, v. 14, n. 4, p. 910-919, 2018.

KELM, J. M.; et al. **Design of experiments to optimize cell culture conditions: Applications in three-dimensional multicellular tumor spheroid formation**. Biotechnology and Bioengineering, v. 83, n. 2, p. 173-180, 2003.

KIM, J.; et al. **3D cell culture models: Applications in cancer research and tissue engineering**. Journal of Cellular Physiology, v. 234, n. 2, p. 203-213, 2019.

KLAMT, F.; et al. **O uso de modelos celulares 3D de esferoides tumorais como uma plataforma alternativa pré-clínica entre o cultivo de células em monocamadas e o uso de modelos animais na pesquisa e triagem de novas terapias anticâncer**. Atena Editora, 2023. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/post/o-uso-de-modelos-celulares-3d-de-esferoides-tumorais-como-uma-plataforma-alternativa-pre-clinica-entre-o-cultivo-de-celulas-em-monocamadas-e-o-uso-de-modelos-animais-na-pesquisa-e-triagem-de-novas-terapias-anticancer>. Acesso em: 10 de junho de 2024.

KOH, B. I.; et al. **Decellularized matrix for organotypic 3D culture models of ovarian cancer metastasis**. Biomaterials Science, v. 6, n. 8, p. 2292-2302, 2018.

LACROIX, M. et al. **A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival**. Journal of Neurosurgery, v. 95, n. 2, p. 190-198, 2001.

LANCASTER, M. A.; et al. **Cerebral organoids model human brain development and microcephaly**. Nature, v. 501, n. 7467, p. 373-379, 2013.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. **Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells**. Nature Protocols, v. 9, n. 10, p. 2329-2340, 2014.

LEMKE, J.; et al. **3D cell culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid models**. Journal of Biotechnology, v. 205, p. 81-91, 2015.

LOUIS, D. N. et al. **The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary**. Neuro-Oncology, 2021

LOUIS, D. N. et al. **The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system**. Acta Neuropathologica, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOUIS, David N. et al. **WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: A summary**. Neuro-Oncology, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

LOUIS, David N. et al. **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary**. Acta Neuropathologica, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LOUIS, David N. et al. **WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary**. Neuro-Oncology, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

KLAMT, F.; et al. **O uso de modelos celulares 3D de esferoides tumorais como uma plataforma alternativa pré-clínica entre o cultivo de células em monocamadas e o uso de modelos animais na pesquisa e triagem de novas terapias anticâncer**. Atena Editora, 2023. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/post/o-uso-de-modelos-celulares-3d-de-esferoides-tumorais-como-uma-plataforma-alternativa-pre-clinica-entre-o-cultivo-de-celulas-em-monocamadas-e-o-uso-de-modelos-animais-na-pesquisa-e-triagem-de-novas-terapias-anticancer>. Acesso em: 10 de junho de 2024.

KOH, B. I.; et al. **Decellularized matrix for organotypic 3D culture models of ovarian cancer metastasis**. Biomaterials Science, v. 6, n. 8, p. 2292-2302, 2018.

LACROIX, M. et al. **A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival**. Journal of Neurosurgery, v. 95, n. 2, p. 190-198, 2001.

LANCASTER, M. A.; et al. **Cerebral organoids model human brain development and microcephaly**. Nature, v. 501, n. 7467, p. 373-379, 2013.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. **Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells**. Nature Protocols, v. 9, n. 10, p. 2329-2340, 2014.

LEMKE, J.; et al. **3D cell culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid models**. Journal of Biotechnology, v. 205, p. 81-91, 2015.

LOUIS, D. N. et al. **The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary**. Neuro-Oncology, 2021

LOUIS, D. N. et al. **The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system**. Acta Neuropathologica, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOUIS, David N. et al. **WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: A summary**. Neuro-Oncology, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

LOUIS, David N. et al. **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary**. Acta Neuropathologica, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LOUIS, David N. et al. **WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.** *Neuro-Oncology*, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

MALLICK, S. et al. **Recurrence patterns in glioblastoma multiforme.** *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 33, p. 99-104, 2016.

MA, L.; et al. **3D bioprinting in cancer research: From benchtop to bedside.** *Biotechnology Advances*, v. 55, p. 107823, 2023.

MARTINEZ, R.; ESTELLER, M. **The DNA methylome of glioblastoma multiforme.** *Neurobiology of Disease*, v. 39, n. 1, p. 102-111, 2010.

MARTINOVICH, K. M.; et al. **Primary cell culture: Advancements and applications.** *Frontiers in Biology*, v. 12, p. 72-82, 2017.

MCCRACKEN, K. W.; et al. **Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids.** *Nature*, v. 516, n. 7531, p. 400-404, 2014.

MDPI. **Recent advances in carcinogenesis transcription factors: biomarkers and targeted therapies.** *Cancers*, v. 15, n. 19, 2023.

MDPI. **Prognostic and predictive biomarkers in gliomas.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, p. 10373, 2021

MEYERS, J.; CRAIG, S. W.; ODDE, D. J. **Potential for control of signaling pathways via cell size and shape.** *Current Biology*, v. 16, n. 9, p. 885-892, 2006.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** 4. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: Inca, 2018.

MITRAKAS, D.; et al. **Oxygen gradients and hypoxia-induced responses in three-dimensional tumor cell cultures.** *Biotechnology Advances*, v. 53, p. 107744, 2023.

MSEKA, G.; BAMBURG, J. R.; CAAMER, L. Cellular responses impacted by specific protein interactions. *Journal of Cell Biology*, v. 172, n. 4, p. 567-576, 2007.

MUELLER-KLIESER, W.; FREYER, J. P.; SUTHERLAND, R. M. **Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids.** *British journal of cancer*, v. 53, n. 3, p. 345, 1986.

MUELLER-KLIESER, W. **Multicellular spheroids: A review on cellular aggregates in cancer research.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 113, p. 101-122, 1986.

NAGELKERKE, A.; et al. **Improved drug screening of cancer cells in 3D culture by hypoxia-mediated stem cell induction.** *Biomaterials*, v. 34, n. 34, p. 6305-6318, 2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Glioblastoma.** 2023. Disponível em: https://www.cancer.gov/types/brain/patient/brain-treatment-pdq#_242. Acesso em: 09 de agosto de 2024.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Glioblastoma research: making progress.** 2017. Disponível em:

<https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/glioblastoma-research-making-progress>. Acesso em: 09 de agosto de 2024.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). ImageJ: Image Processing and Analysis in Java. Bethesda, Maryland: NIH, 2024. Disponível em: <https://imagej.net/ij/>. Acesso em: 10 out. 2024.

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. **Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 22, p. 287-309, 2006.

NUNES, A. S.; BARBOSA, M. A.; GOMES, A. M. **3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 116, n. 1, p. 206-226, 2019. DOI: 10.1002/bit.26845

OHGAKI, Hiroko. **Epidemiology of brain tumors.** *Methods in Molecular Biology*, v. 472, p. 323-342, 2009.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. **Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma.** *The American Journal of Pathology*, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. **Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma.** *The American Journal of Pathology*, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2005.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. **Epidemiology and etiology of gliomas.** *Acta Neuropathologica*, v. 109, n. 1, p. 93-108, 2005.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. **Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review.** *JAMA*, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Câncer. Genebra, 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 . Acesso em: 04 de junho de 2024

OSTROM, Quinn T. et al. **CBTRUS Statistical Report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011.** *Neuro-Oncology*, v. 16, n. suppl_4, p. iv1-iv63, 2014.

OSTROM, Quinn T. et al. **CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015.** *Neuro-Oncology*, v. 20, n. suppl_4, p. iv1-iv86, 2018.

OSTROM, Q. T. et al. **Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018.** *Neuro-Oncology*, v. 23, suplemento 3, p. iii1–iii105, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab200>. Acesso em: 10 out. 2024.

PAGNOTTA, S. M.; et al. **3D cell culture systems for modeling cancer progression and drug responses.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 853761, 2022.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. **The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 10, p. 839-845, 2007.

PAVON, L. F., et al. **Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco CD133+ de glioblastoma humano**. *einstein* (São Paulo), São Paulo, v. 10, n. 2, p. 197-202, jun. 2012. Disponível em: <<https://journal.einstein.br/pt-br/article/isolamento-cultivo-e-caracterizacao-de-celulas-tronco-cd133-de-glioblastoma-humano/>>. Acesso em: 5 ago. 2024.

PRADHAN, S.; et al. **Development and applications of nanoparticle-mediated immunotherapy in cancer treatment**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 106, n. 6, p. 1537-1547, 2017.

PRESCOTT, M. J.; LANGERMANS, J. A. M.; RAGAN, I. **Applying the 3Rs to non-human primate research: Barriers and solutions**. *Drug Discovery Today: Disease Models*, v. 23, n. 4, p. 43-52, 2017.

PRESTWICH, G. D. **Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: A pragmatic approach**. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 101, n. 6, p. 1370-1383, 2008.

RABIE, M.; et al. **3D fibrous scaffolds for cancer cell migration, invasion, and therapeutic response studies**. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 110, n. 1, p. 162-176, 2022.

ROOSENS, T.; PUYPE, M.; CORNELISSEN, R. **Microfluidic 3D cell culture systems for cellular immunology**. *Bioengineering*, v. 4, n. 2, p. 38, 2017.

ROSSEAU, G.; SHAPIRO, W. R.; GREENBERG, S. **Current strategies for the treatment of gliomas**. *Neurosurgery Clinics of North America*, v. 19, n. 3, p. 439-454, 2008.

ROUWKEMA, J.; RIVRON, N. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. **Vascularization in tissue engineering**. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 8, p. 434-441, 2008.

ROUWKEMA, J.; RIVRON, N. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. **Engineering vascularised tissues *in vitro***. *European Cells & Materials*, v. 15, p. 27-40, 2008.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

SALEH, Najla Adel. **Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais**. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SANAI, Nader; ALVAREZ-BUYLLA, Arturo; BERGER, Mitchel S. **Neural stem cells and the origin of gliomas**. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 8, p. 811-822, 2005.

SANAI, N.; BERGER, M. S. **Glioma extent of resection and its impact on patient outcome**. *Neurosurgery*, v. 62, n. 4, p. 753-766, 2008.

SCHWARTZBAUM, J. A. et al. **Epidemiology and molecular pathology of glioma**. *Nature Clinical Practice Neurology*, v. 2, n. 9, p. 494-503, 2006.

SHAMIR, E. R.; EWALD, A. J. **Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 10, p. 647-664, 2014.

SHYAM, R.; et al. **Spheroids as models of cancer progression and treatment response**. Journal of Cellular Physiology, v. 238, n. 2, p. 610-627, 2023.

SILVA, João A.; PEREIRA, Maria C.; OLIVEIRA, Ana B. **Efeitos da troca de meio no crescimento de culturas celulares tridimensionais**. Journal of Cell Biology, v. 50, n. 3, p. 45-58, 2020.

SOUZA, Mariana L.; PEREIRA, Luiz F.; CARVALHO, Ana R. **Avaliação do crescimento e viabilidade de esferoides tridimensionais em culturas celulares**. Journal of Cellular Oncology, v. 45, n. 2, p. 120-130, 2019.

STUPP, R. et al. **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma**. New England Journal of Medicine, v. 352, n. 10, p. 987-996, 2005.

TABATABAI, G.; WELLER, M.; WICK, W. **Clinical implications of molecular neuropathology and biomarkers in gliomas**. Current Opinion in Oncology, v. 22, n. 6, p. 639-644, 2010.

TALUKDAR, Y.; et al. **The role of the 3D environment in promoting cellular interactions and development of 3D spheroids for modeling tissue biology and disease**. Journal of Biomechanics, v. 44, n. 9, p. 1533-1537, 2011.

TAKAHASHI, H.; INOUE, A.; KAWABE, Y. et al. **Recent advances in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy**. Brain Tumor Pathology, v. 32, p. 31-40, 2015. DOI: 10.1007/s10014-015-0236-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10014-015-0236-8> . Acesso em: 1 set. 2024.

TEVLEK, F.; et al. **Innovations in 3D tumor models: Impact on the future of cancer drug discovery and precision medicine**. Pharmaceutical Research, v. 40, n. 2, p. 345-359, 2023.

THE BRAIN TUMOUR CHARITY. **Glioblastoma prognosis**. The Brain Tumour Charity, 2023. Disponível em: <https://www.thebraintumourcharity.org/diagnosis-treatment/types/glioblastoma/glioblastoma-prognosis/>. Acesso em: 25 jun. 2024.

VALADARES, A. R.; et al. **Perfil Anatomopatológico e Imuno-histoquímico de Gliomas de Pacientes da Região de Maringá-PR**. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 67, n. 3, p. 1-9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2021v67n3.1287> . Acesso em: 31 de agosto de 2024.

VESCOVI, A. L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B. A. **Brain tumour stem cells**. Nature Reviews Cancer, v. 6, n. 6, p. 425-436, 2006.

VINCI, M. et al. **Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay**. Journal of Visualized Experiments, n. 66, p. e3791, 2012. DOI: 10.3791/3791.

VON DER MARK, K.; et al. **Role of anchorages in shape and growth control of normal and malignant cells**. Nature, v. 267, p. 531-533, 1977.

VRANIC, S.; AL MOUSTAFA, A.-E. **Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: recent insights and advancements**. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 1, p. 130, 2021.

WEAVER, V. M.; et al. **β 4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium.** *Cancer Cell*, v. 2, n. 3, p. 205-216, 2002.

WELLER, M. et al. **Glioblastoma: Current management and future directions.** Journal of Neuro-Oncology, v. 108, n. 2, p. 263-274, 2012.

WELLER, M. **Glioma diagnosis and management:** Current approaches. Journal of Neuro-Oncology, v. 103, n. 3, p. 397-409, 2011.

WELLER, Michael. **Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma.** Swiss Medical Weekly, v. 141, p. w13210, 2011.

WELLER, M. **Novel diagnostic markers in gliomas:** what do they mean. *Onkologie*, v. 34, n. 8-9, p. 436-437, 2011.

WEN, P. Y.; CAIRNCROSS, J. G. **Glioblastoma:** a more biologically and clinically heterogeneous disease than ever before. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 60, n. 3, p. 166-177, 2010.

WENZEL, C.; et al. **3D cell culture models:** Tools for enhancing drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, v. 6, n. 12, p. 1491-1498, 2014.

WOLFF, J. E. et al. **Nitrosoureas in the treatment of high-grade glioma in children.** Journal of Neuro-Oncology, v. 87, n. 3, p. 243-250, 2008.

WU, D.; et al. **Three-dimensional bioprinting of liver models:** Applications in tissue engineering and drug testing. *Tissue Engineering Part A*, v. 22, n. 8, p. 712-722, 2016.

XIN, Y.; et al. **2D versus 3D cell culture models in cancer research.** *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 8, p. 10399-10407, 2019.

YIN, Y.; et al. **3D cell culture in drug discovery: Recent progress and future prospects.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 108, n. 1, p. 2-17, 2019.

ZHAI, Y.; et al. **Development of 3D cell culture techniques to enhance drug screening and toxicity assessment.** *Journal of Biomedical Science and Engineering*, v. 12, p. 117-125, 2019.