

Tecnologias celulares avançadas: desafios biotecnológicos e regulatórios

José Mauro Granjeiro^{1,II}

Isabella Delgado^{III}

Norma Labarthe^{III}

A expectativa de vida média dos seres humanos vem aumentando progressivamente. Contudo, é fato inegável que, além de viver mais, se quer viver com qualidade de vida. Neste cenário, as perspectivas do uso de células como ferramentas tornaram-se um foco importante e profícuo da pesquisa mundial.

Em estudo recente, Silva Junior e Ramalho¹ destacaram que nas próximas duas décadas, devido ao envelhecimento da população, as doenças do sistema circulatório continuarão responsáveis pela maior parte das mortes, embora com tendência de diminuir, seguida das doenças oncológicas e de doenças degenerativas como Alzheimer e demência. Tais enfermidades implicam em alto impacto no custo do sistema de saúde público e privado. Os autores também consideram a tendência de aumento das causas de morte externa, concentradas em agressões e acidentes de trânsito, com grande impacto na população.

Por outro lado, resultados obtidos a partir de estudos clínicos concluídos e em andamento indicam um enorme potencial terapêutico da terapia baseada em células estaminais (SC) no tratamento de distúrbios degenerativos, autoimunes e genéticos².

Atualmente tem se discutido intensamente as questões éticas e de segurança do uso de células-tronco embrionárias humanas (hESC), células-tronco induzidas (iPSC) e a terapia baseada em células-tronco mesenquimais (MSC). Uma evidência simples do interesse nesses temas pode ser obtida na base de dados PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov), na qual, entre os anos de 2008 e 2017, recupera-se um número significativo de artigos para as palavras-chave “*human embryonic stem cell*” (hESC), “*human iPSC*” (hiPSC) e “*human mesenchymal stem cells*” (hMSC). Ao todo, foram 13.515, 10.288 e 29.464 artigos, respectivamente, na busca realizada em 06 de fevereiro de 2018. O interesse nestes campos da ciência aumentou vertiginosamente para hiPSC e hMSC, mas manteve-se praticamente estável neste período para hESC, sendo a pesquisa em hMSC a mais numerosa (Figura).

As hESC são células com cariótipo normal, capazes de se dividir indefinidamente e se diferenciar em qualquer tipo celular tanto *in vitro* como *in vivo*³. Originam-se a partir da massa celular interna pluripotente dos embriões pré-implantação⁴, sendo identificadas por marcadores específicos. Contudo, questiona-se se é moralmente aceitável buscar novas terapias para curar doenças à custa de destruir um embrião humano precoce. Este dilema ético é tratado de modo diferente em muitos países. Na Itália, por exemplo, é proibida qualquer pesquisa com hESC, enquanto no Reino Unido a pesquisa é permitida, mas seu uso terapêutico ou na reprodução é proibido. No Brasil, a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005⁵ permite a pesquisa e o uso terapêutico das hESC e atribui à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) sua regulamentação (Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005⁶). A proposta de regulamentação brasileira e a possibilidade jurídica de registro e comercialização de produtos de terapias avançadas no Brasil serão mais profundamente detalhadas nos artigos de Garcia et al. e de Parca et al., publicados no presente número temático, que ainda traz a abordagem dos principais riscos envolvidos na produção e no fornecimento dos produtos de terapias avançadas no artigo de Silva Junior et al.

A plasticidade das hESC estimula inúmeras aplicações clínicas, mas o controle de sua proliferação *in vivo* não tem se mostrado simples, levando ao desenvolvimento de teratomas^{7,8}. Para superar essa importante limitação, a diferenciação completa no tipo celular desejado antes da injeção tem se mostrado promissora e com potencial de aplicação clínica⁹. Na base de dados *ClinicalTrials.org*, em levantamento realizado em 06 de fevereiro de 2018, foram identificados 34 estudos utilizando hMSC, dos quais sete foram concluídos. Há no Brasil um estudo, da Universidade Federal de São Paulo, na fase de recrutamento (Tabela).

^I Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Universidade Federal Fluminense (UFF), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: jmgranjeiro@gmail.com

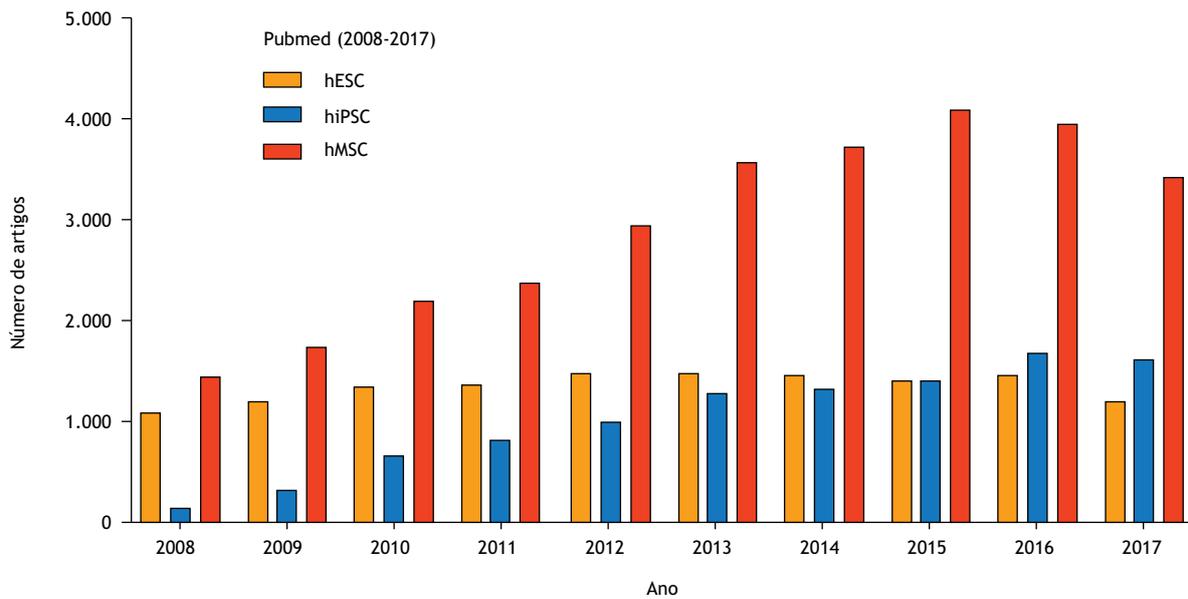


Figura. Número de artigos publicados entre 2008 e 2017 na base PubMed para as palavras-chave *human embryonic stem cell* (hESC), *human iPSC* (hiPSC) e *human mesenchymal stem cells* (hMSC), conforme a legenda.

As iPSC surgiram como uma alternativa ao uso de embriões, sendo obtidas de células somáticas, mas compartilham diversas semelhanças com as hESC, particularmente a plasticidade, a partir da superexpressão de alguns fatores como o c-MYC¹⁰. As iPSC podem ser obtidas de pacientes com doenças específicas, tornando possível a avaliação de fármacos e a geração de modelos *in vitro* de doenças humanas. Do ponto de vista terapêutico, não apresentam risco de rejeição imunológica. Do mesmo modo que as hESC, as iPSC não diferenciadas quando implantadas podem resultar em tumores devido à proliferação e diferenciação descontrolada causadas por anormalidades genéticas. O uso terapêutico das iPSC iniciou-se com pacientes portadores de degeneração macular¹¹. E paralelamente, 21 estudos clínicos vêm sendo conduzidos (www.clinicaltrials.gov, acessado em 06/02/2018) visando o tratamento de diabetes, desordens neurológicas, problemas cardíacos, entre outras doenças, dos quais dois estudos estão concluídos (Tabela).

Os avanços na aplicação clínicas das iPSC requerem detalhada análise de mutações presentes nas células somáticas aliada ao uso de rígidos procedimentos operacionais padrão para a verificação rotineira de anormalidades genéticas antes do uso clínico¹². Neste número temático, Biagi et al. discutem as potencialidades de cardiomiócitos obtidos a partir de iPSC para a descoberta de novos fármacos, com grande impacto potencial na redução do número de animais utilizados em testes *in vivo*, além de maior poder preditivo.

As células-tronco mesenquimais, semelhantes aos fibroblastos embora com núcleo alongado e cromatina condensada, são frequentemente isoladas da medula óssea, do tecido adiposo, do sangue de cordão umbilical e polpa dentária^{13,14}. São células multipotentes que apresentam capacidade de autorrenovação. A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT - *International*

Tabela. Estudos clínicos registrados na base de dados *ClinicalTrials.org* segundo a situação do andamento para *human embryonic stem cell* (hESC), *human iPSC* (hiPSC) e *human mesenchymal stem cells* (hMSC).

Situação em 06 de fevereiro de 2018	hESC	hiPSC	hMSC
Ainda não recrutando	1	3	31
Recrutando	12	8	57
Recrutando por convite	1	3	4
Ativo, não recrutando	4	2	28
Suspensão	1	0	3
Finalizado	1	1	4
Completo	7	2	60
Retirado	1	0	7
Desconhecido ¹	6	2	50
Subtotal	34	21	244

¹ Estudo passou a data de conclusão e sua situação não foi verificada há mais de dois anos.

Society for Cellular Therapy) estabeleceu critérios mínimos para a caracterização uniforme de MSC, como aderência plástica, potencial de diferenciação em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica, expressão de CD105, CD73, CD90 e ausência de marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR¹⁵.

As MSC são conhecidas desde os trabalhos iniciais na década de 1970¹⁶. Nestas últimas décadas, muitos estudos básicos e clínicos investigam o uso terapêutico das MSC como no tratamento da osteoporose¹⁷, reparo de tendões¹⁸, doença renal¹⁹, fígado²⁰ e infarto do miocárdio²¹. Os resultados evidenciam que MSC da medula óssea e do tecido adiposo, tanto alogênicas como autólogas, são seguras, simples e efetivas para o tratamento de doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas, como a



Diabetes Mellitus tipo I, abordado neste número por Leal-Lopes et al. A preocupação quanto ao uso de MSC deve-se ao risco de diferenciação indesejada e potencial para suprimir a resposta imune antitumoral e promover a angiogênese que pode contribuir para o crescimento do tumor e metástase. Calcificação do miocárdio infartado ocorreu após o uso de MSC da medula óssea não fracionada²². Mais de duas centenas de estudos clínicos estão registrados na base *ClinicalTrials.org* (www.clinicaltrials.org, acessado em 06-02-2018), dos quais dois estão na fase de recrutamento no Brasil: um avaliando as MSC para tratamento de glaucoma avançado (Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina) e outro em pacientes transplantados com severa resistência ao tratamento com corticosteroides (Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Centro de Tecnologia Celular).

A utilização de células humanas, adultas ou embrionárias, transcendem as aplicações clínicas. Complexos processos biotecnológicos vêm sendo desenvolvidos e associados, por exemplo a microfluídica, resultando em tecnologias capazes de permitir novas estratégias para estudos toxicológicos como o *organ-on-a-chip*²³, bem como associada a nanopartículas como relatado neste fascículo por Jasmin e Borojevic. Há grande expectativa de que os novos modelos de cultivo tridimensional, associados ou não à microfluídica, possam promover importante redução dos testes em animais e, simultaneamente, aumentar a preditividade dos testes^{24,25,26}, como vem ocorrendo com os modelos de pele equivalente apresentados no nosso número temático por De Vecchi et al. Os desafios relacionados ao cultivo de células tridimensional são detalhadamente abordados por Cavalheiro et al., assim como as perspectivas regulatórias do uso de células-tronco e iPSC em métodos alternativos ao uso de animais; tema descrito neste fascículo por Biagi et al.

É fundamental enfatizar que o uso dos produtos de terapias avançadas, bem como o de tecnologia celular para testes alternativos, depende crucialmente de um rígido controle da qualidade dos insumos e processos. No presente número temático este aspecto é abordado por Carias et al., que destacam os testes prevalentemente citados na literatura científica ou em normas sanitárias, aplicados na avaliação da qualidade de células primárias humanas, passíveis de serem inseridos na rotina dos Centros de Processamento Celular.

Também neste número, Folgueras-Flatschart et al. chamam a atenção para os principais contaminantes das culturas celulares, bem como a incorreta determinação da identidade das células. Ainda, destaca-se a necessidade de substituição do soro fetal bovino pelo equivalente humano, abordado nos artigos de Menezes et al. e Takamori et al., incluindo como fonte o plasma rico em plaquetas, descrito por Teixeira et al. Também contamos neste número com o artigo de da Silva et al. que descrevem o uso da tecnologia celular para o desenvolvimento de testes toxicológicos aplicados ao controle da qualidade de produtos injetáveis no Brasil.

Neste contexto, além da aplicação das tecnologias celulares avançadas na terapia de diversas doenças, é inegável o potencial disruptivo das hESC, iPSC e MSC no campo da Toxicologia.

A capacidade crescente de mimetizar *in vitro* tecidos, aliada ao desenvolvimento das ferramentas analíticas e de imagem, têm possibilitado desenvolver testes *in vitro* capazes de reduzir o uso de animais e, em alguns casos, até substituí-los para alguns desfechos toxicológicos específicos. O *The European Union Reference Laboratory for alternatives to animal Testing* (EURL ECVAM) desenvolveu o Serviço de Banco de Dados em Métodos Alternativos ao Uso de Animais (DB-ALM, *database service on Alternative Methods to animal experimentation*). Segundo informações obtidas do sítio eletrônico (<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/> - acessado em 06-02-2018), o DB-ALM é um serviço de banco de dados público e factual que fornece informações avaliadas sobre o desenvolvimento e aplicações de métodos avançados e alternativos para experimentação animal em Ciências Biomédicas e Toxicologia, tanto em pesquisa quanto para fins regulatórios.

A versão atual do DB-ALM cobre os seguintes Conjunto de Dados:

1. **Resumos de tópicos:** Revisão temática de *data sheets* na forma de resumo executivo sobre métodos alternativos, disponível no DB-ALM para uma área de tópico inteira (por exemplo: Absorção percutânea, Irritação ocular).
2. **Descrições do método:** dois níveis de detalhe: i) resumos de métodos que cobrem o princípio científico, as necessidades abordadas, as principais aplicações e a situação atual do desenvolvimento, validação ou aceitação do método; ii) protocolos com instruções técnicas detalhadas para permitir a transferência de um método para um laboratório.
3. **Descrições de projetos e estudos:** avaliações de métodos, incluindo projetos integrados da União Europeia (UE) e estudos de validação formal selecionados como registros sumários, referenciados com setores de dados relacionados.
4. **Compostos e resultados de testes:** listas de substâncias (mais de 3.000) e investigações individuais realizadas com métodos incluídos no DB-ALM.
5. **Pessoas e instituições:** Informações sobre pessoas e instituições ativas no campo de métodos alternativos são fornecidas com base na participação voluntária.
6. **Bibliografia:** Todas as referências analisadas para a compilação das folhas de dados.

Por exemplo, no tema cultivo celular, é possível encontrar um protocolo sobre o cultivo de células-tronco (*Method Summary*, nº 165 - *Differentiation of induced-pluripotent stem cells into post-mitotic neurons and glial cells - mixed culture*), o qual descreve todos os estágios de diferenciação de células-tronco pluripotentes humanas induzidas em células precursoras neurais e ainda em culturas mistas de neurônios pós-mitóticos e células gliais. Com relação à toxicidade local, destacam-se os testes de irritação ocular EpiOcular™ (*Method Summary*, nº 164) e o Modelo de Epitélio Córneo Humano SkinEthic™. Para análise da sensibilização dérmica, o método KeratinoSens™ (*Method Summary* nº 155 - OECD TG nº 442D) que permite discriminar entre compostos químicos que sensibilizam a pele daqueles que não sensibilizam.



O que se pode observar concretamente é que avanços no campo da Tecnologia Celular, na Bioinformática (tratando *big data* das ômicas), e nas recentes descobertas relativas às Vias de Efeito Adverso (*Adverse Outcome Pathways*) têm transformado a Toxicologia em uma ciência mais preditiva e a Toxicologia Regulatória em uma subárea que cada vez mais busca elucidar as bases mecanísticas por trás dos eventos adversos induzidos por xenobióticos^{27,28}. Hoje, as abordagens multidisciplinares, fundamentadas em conhecimentos sobre processos físicos, químicos e biológicos, integram métodos *in vitro*, *in silico* e ômicas capazes de identificar potenciais efeitos tóxicos de compostos químicos. O que se tem visto na prática é o uso desses métodos em Estratégias de Teste Integradas (*Integrated Testing Strategies*), juntamente com dados experimentais gerados por testes alternativos (não animais), como testes *in vitro* e rastreamento de alto rendimento (*High Throughput Content Screening*), concorrendo para análises com maior poder preditivo e aplicabilidade aos seres humanos²⁹.

Destarte, resta claro que as tecnologias celulares se apresentam como promissoras ferramentas terapêuticas e como modelos *in vitro* para testes toxicológicos alternativos, porém a segurança jurídica para seu uso e comercialização, o estabelecimento de protocolos operacionais padrão para manipulação e a demonstração da segurança e qualidade estão ainda em construção.

Comprometidos em contribuir para o avanço regulatório e da inovação, a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), em parceria com a Anvisa, promoveram, em Brasília, nos dias 8 e 9 de maio de 2017, o Seminário Internacional de Produtos de Terapias Avançadas e Novas Tecnologias utilizando células humanas.

O foco do seminário foi discutir uma regulamentação que permita o avanço das tecnologias da fronteira do conhecimento na área de saúde, tais como as terapias gênica e celular, a bioengenharia de tecidos e seus benefícios aos portadores de doenças crônico-degenerativas.

Especialistas, pesquisadores e técnicos da Anvisa, dos Ministérios da Saúde (MS), de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC), da Advocacia Geral da União (AGU), de universidades brasileiras, do Inmetro, da Fiocruz, da ABDI, além de representantes de empresas e *startups* nacionais e internacionais participaram do evento, evidenciando que o país caminha efetivamente para a inovação e aplicação tecnológica neste campo.

Ao longo do evento foi consenso que seria relevante consolidar parte das discussões na forma de artigos científicos que abordassem as diferentes perspectivas discutidas no seminário. Assim, neste número temático da *Visa em Debate*, consolidamos o esforço conjunto de autores, editores e equipe da revista. Ao longo das próximas páginas você, leitor, encontrará diversas abordagens sobre a utilização de células como ferramentas tanto para a terapia de doenças como para avaliação do perigo de compostos químicos. As oportunidades e desafios são imensos, mas a determinação para aprofundar-se no conhecimento e a possível aplicação em favor do bem-estar das pessoas são, igualmente, espetaculares.

Desejamos uma boa leitura!

REFERÊNCIAS

1. Silva Junior JB, Ramalho WM. Cenário epidemiológico do Brasil em 2033: uma prospecção sobre as próximas duas décadas. Texto para discussão. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2015.
2. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *Int J Med Sci.* 2018;15(1):36-45. <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>
3. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
4. Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M et al. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells.* 2006;24(12):2669-76. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0377>
5. Brasil. Lei Nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 28 mar 2005.
6. Brasil. Decreto Nº 5.591, de 22 de novembro de 2005. Regulamenta dispositivos da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, que regulamenta os incisos II, IV e V do §1º do art. 225 da Constituição, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 23 nov 2004.
7. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 2007;21(7):1345-57. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6769com>
8. Prokhorova TA, Harkness LM, Frandsen U, Ditzel N, Schröder HD, Burns JS et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of Matrigel. *Stem Cells Dev.* 2009;18(1):47-54. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0266>



9. Song WK, Park KM, Kim HJ, Lee JH, Choi J, Chong SY et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Reports*. 2015;4(5):860-72. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.005>
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
11. Cyranoski D. Japanese man is first to receive 'reprogrammed' stem cells from another person. *Nature*. 2017 Mar 28. <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21730>
12. Martin U. Therapeutic application of pluripotent stem cells: challenges and risks. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:229. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00229>
13. Saleh R, Reza HM. Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):222. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0679-y>
14. Leyendecker Junior A, Gomes Pinheiro CC, Lazzaretti Fernandes T, Franco Bueno D. The use of human dental pulp stem cells for *in vivo* bone tissue engineering: A systematic review. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731417752766. <https://doi.org/10.1177/2041731417752766>
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
16. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.71>
17. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal stem cells: cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):E360. <https://doi.org/10.3390/ijms19020360>
18. Yan Z, Yin H, Nerlich M, Pfeifer CG, Docheva D. Boosting tendon repair: interplay of cells, growth factors and scaffold-free and gel-based carriers. *J Exp Orthop*. 2018;5(1):1. <https://doi.org/10.1186/s40634-017-0117-1>
19. Peired AJ, Sisti A, Romagnani P. Mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease: a review of clinical evidence. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4798639. <https://doi.org/10.1155/2016/4798639>
20. Tsuchiya A, Kojima Y, Ikarashi S, Seino S, Watanabe Y, Kawata Y et al. Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver diseases and inflammatory bowel diseases. *Inflamm Regen*. 2017;37(1):16. <https://doi.org/10.1186/s41232-017-0045-6>
21. Miao C, Lei M, Hu W, Han S, Wang Q. A brief review: the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):242. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0697-9>
22. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109(25):3154-7. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000134696.08436.65>
23. Wu J, Dong M, Santos S, Rigatto C, Liu Y, Lin F. Lab-on-a-chip platforms for detection of cardiovascular disease and cancer biomarkers. *Sensors (Basel)*. 2017;17(12):E2934. <https://doi.org/10.3390/s17122934>
24. Pamies D, Hartung T, Hogberg HT. Biological and medical applications of a brain-on-a-chip. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239(9):1096-107. <https://doi.org/10.1177/1535370214537738>
25. Silva KR, Rezende RA, Pereira FD, Gruber P, Stuart MP, Ovsianikov A et al. Delivery of human adipose stem cells spheroids into lockyballs. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166073>
26. Baptista LS, Silva KR, Pedrosa CS, Amaral RJ, Belizário JV, Borojevic R et al. Bioengineered cartilage in a scaffold-free method by human cartilage-derived progenitor cells: a comparison with human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Artif Organs*. 2013;37(12):1068-75. <https://doi.org/10.1111/aor.12121>
27. Leist M, Ghallab A, Graepel R, Marchan R, Hassan R, Bennekou SH et al. Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. *Arch Toxicol*. 2017;91(11):3477-505. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2045-3> PMID:29051992
28. Tollefsen KE, Scholz S, Cronin MT, Edwards SW, de Knecht J, Crofton K et al. Applying Adverse Outcome Pathways (AOPs) to support Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014;70(3):629-40. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.09.009>
29. Schmidt BZ, Lehmann M, Gutbier S, Nembo E, Noel S, Smirnova L et al. In vitro acute and developmental neurotoxicity screening: an overview of cellular platforms and high-throughput technical possibilities. *Arch Toxicol*. 2017;91(1):1-33. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1805-9>

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.