

Sumário

VOLUME 6
FASCÍCULO 1
2018

- EDITORIAL**
- 1 **Tecnologias celulares avançadas: desafios biotecnológicos e regulatórios**
José Mauro Granjeiro, Isabella Delgado, Norma Labarthe
- DEBATE**
- 6 **Possibilidade jurídica de registro e comercialização de produtos de terapias avançadas no Brasil**
Luisa Abreu Obici Garcia, Marília Rodrigues Mendes Takao, Renata Miranda Parca, João Batista da Silva Junior
- ARTIGO**
- 15 **Proposta de marco regulatório para os Produtos de Terapias Avançadas no Brasil**
Renata Miranda Parca, Marília Rodrigues Mendes Takao, João Batista da Silva Junior
- 23 **Produtos de Terapias Avançadas: uma introdução ao gerenciamento de riscos**
João Batista Silva Junior, Marília Rodrigues Mendes Takao, Renata Miranda Parca
- 32 **Human cardiomyocytes for drug discovery**
Diogo Gonçalves Biagi, Jéssica Gonçalves, Estela Cruvinel, Renata Damiani, Flavia Valgode, Fabiana Medeiros, Camila G Moreira, Evelyn Santos, Rodrigo Marcon, Calixto João, Gabriela Venturini, Alexandre Pereira, Éden Ferreira, Renato Mortara, Marcos C Valadares
- 41 **Advanced Therapy Medicinal Products in type I diabetes mellitus: technological and regulatory challenges**
Camila Leal-Lopes, Marluce da Cunha Mantovani, Mari Cleide Sogayar
- 56 **Uso de nanopartículas no rastreamento de células em terapias avançadas: possibilidades e desafios para a aplicação clínica**
Jasmin, Radovan Borojevic
- 64 **Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted Reconstructed Human Epidermis model in Brazil**
Rodrigo De Vecchi, Vanja Dakic, Guilherme Mattos, Anne-Sophie Rigaudeau, Veronica Oliveira, Cristina Garcia, Nathalie Alépée, José Cotovio, Charbel Bouez
- 72 **Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o *in vitro* do *in vivo***
Marianna Cavalheiro, Ana Paula D. N. de Barros, Rafaela de A. Louback, Maria Isabel D. Rossi
- 84 **Qualidade dos produtos de terapias avançadas: requisitos de células extensamente manipuladas usadas em terapias celulares e em bioengenharia**
Rosana Bizon Vieira Carias, Karla Menezes, Esther Rieko Takamori, Radovan Borojevic
- 96 **A importância do controle de qualidade de culturas utilizadas em ensaios biológicos e no desenvolvimento de pesquisas na área de saúde**
Aurea Valadares Folgueras-Flatschart, Bruno Cosme Gomes, Fernanda Leve, Leonardo da Cunha Boldrini
- 109 **Revisão integrativa para substituição do soro fetal bovino por plasma humano rico em plaquetas para cultivo e expansão *ex vivo* de células humanas destinadas às terapias avançadas**
Karla Menezes, Esther Rieko Takamori, Marcus Vinicius Telles Teixeira, Rosana Bizon Vieira Carias, Radovan Borojevic

- 118 **Fibrina rica em plaquetas: preparo, definição da qualidade, uso clínico**
Esther Rieko Takamori, Marcus Vinicius Telles Teixeira, Karla Menezes, Rosana Bizon Vieira Carias, Radovan Borojevic
- 125 **Utilização de plaquetas e de produtos derivados de plaquetas humanas em terapias avançadas**
Marcus Vinicius Telles Teixeira, Esther Rieko Takamori, Karla Menezes, Rosana Bizon Vieira Carias, Radovan Borojevic
- 137 **Métodos alternativos para a detecção de pirogênicos em produtos e ambientes sujeitos a Vigilância Sanitária: avanços e perspectivas no Brasil a partir do reconhecimento internacional do Teste de Ativação de Monócitos**
Cristiane Caldeira da Silva, Carolina Barbara Nogueira de Oliveira, Patrícia dos Santos Carneiro, Eliana Blini Marengo, Katherine Antunes de Mattos, Ricardo Sergio Couto de Almeida, Janaina Spoladore, Gutemberg Gomes Alves, Octavio Augusto França Presgrave, Isabella Fernandes Delgado

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 diferenciarem 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

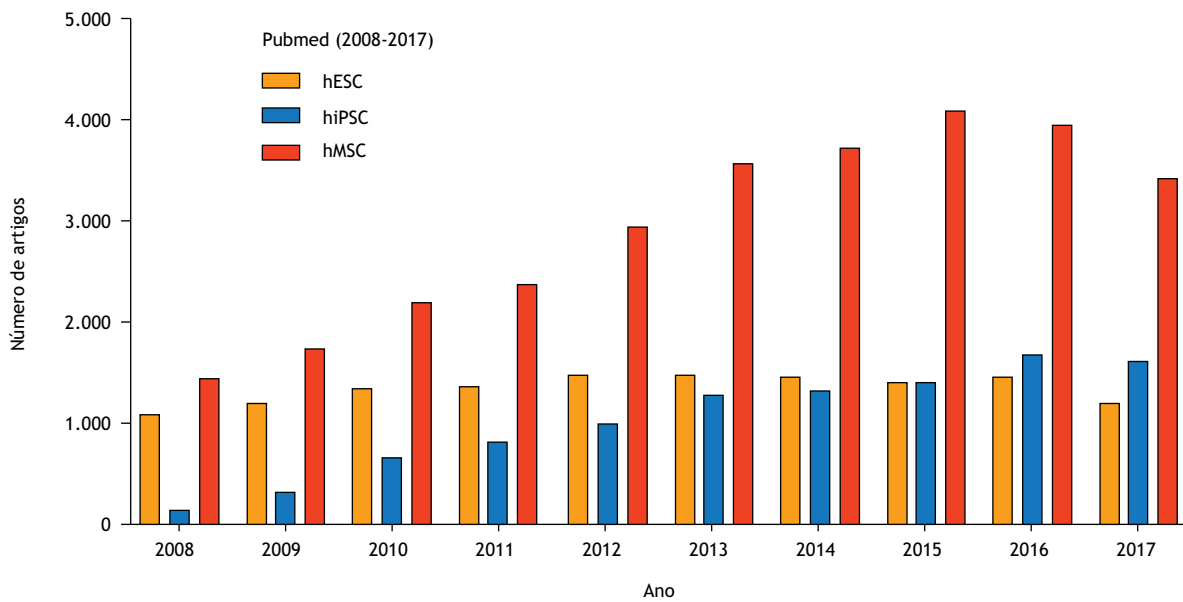


Figura. Número de artigos publicados entre 2008 e 2017 na base PubMed para as palavras-chave *human embryonic stem cell* (hESC), *human iPSC* (hiPSC) e *human mesenchymal stem cells* (hMSC), conforme a legenda.

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.

Possibilidade jurídica de registro e comercialização de produtos de terapias avançadas no Brasil

Legal possibility of marketing authorization and commercialization of advanced therapy medicinal products in Brazil

Luisa Abreu Obici Garcia^I

Marília Rodrigues Mendes Takao^{II,*}

Renata Miranda Parca^{II}

João Batista da Silva Junior^{II}

RESUMO

Em vista do disposto no parágrafo 4º do art. 199 da Constituição Federal Brasileira, de 1988, que veda todo tipo de comercialização de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, a possibilidade de registro sanitário e comercialização dos produtos de origem humana no Brasil passou a ser indagada. Com o advento das Terapias Avançadas, a insegurança jurídica sobre o tema alcançou as questões de caráter regulamentar e permeou preocupações de ordem científica, tecnológica e financeira relacionadas ao setor. Tal percepção ensejou a análise detalhada da matéria pela Procuradoria Federal junto à Anvisa, expressa no Parecer Cons. n° 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU. Expor, no presente artigo, os principais aspectos concernentes à possibilidade jurídica de registro e comercialização de produtos de terapias avançadas no Brasil, com base no teor do Parecer Cons. n° 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU. Descrição do conteúdo do respectivo parecer, considerando os aspectos principais emanados no documento. Por meio da releitura constitucional, o Parecer concluiu pela possibilidade do registro e comercialização dos produtos de terapias avançadas, com fundamento no princípio da dignidade da pessoa humana e nos direitos fundamentais à vida e à saúde, e condicionada a um arcabouço regulatório rigoroso, a ser elaborado.

PALAVRAS-CHAVE: Terapias Avançadas; Células-tronco; Regulamentação; Comercialização; Constituição

ABSTRACT

In view of the provisions of the Constitution of 1988, of the Federative Republic of Brazil, article 199, paragraph 4, which prohibits any form of marketing of organs, tissues and human substances for transplants, research and treatment, the possibility of commercialization and marketing authorization of human origin products in Brazil has been questioned. With the advent of advanced therapies, legal uncertainty on the subject has reached regulatory issues and permeated scientific and investments concerns over the sector. Such perception based the detailed analysis on the matter by Anvisa's Federal Attorney's Office, which was expressed on the Legal Opinion n. 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU and exposed in this article. Outline, in this article, the main aspects concerning the legal possibility of marketing authorization and commercialization of advanced therapy medicinal products in Brazil, based on the Legal Opinion n° 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU. Assessment of the Legal Opinion content and extraction from the document of its main issues. The document concluded for the possibility of a marketing authorization of the advanced therapy medicinal products, considering the principle of human dignity and fundamental rights to life and health, and conditioned it to the elaboration of a strict regulatory framework.

^I Advocacia Geral da União, Brasília, DF, Brasil

^{II} Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Brasília, DF, Brasil

* E-mail: marilia.mendes@anvisa.gov.br

KEYWORDS: Advanced Therapies; Stem Cells; Regulation; Marketing Authorization; Constitution

Recebido: 23 out 2017

Aprovado: 26 jan 2018



INTRODUÇÃO

O desenvolvimento científico e tecnológico tem proporcionado inúmeros avanços na área da medicina. Nesse contexto, as pesquisas com células-tronco, a partir do advento das Terapias Avançadas ocorrido especialmente na última década, têm se apresentado como uma das promessas de benefícios notórios à população^{1,2,3}. Tais pesquisas realizadas em nível mundial cumprem seu papel ao desenvolver estudos para tratamento de uma diversidade de doenças - de comuns a raras àquelas consideradas negligenciadas - para as quais não há tratamento disponível na atualidade ou a única solução terapêutica é o transplante de órgãos ou de tecidos. Para além do objetivo de salvar uma vida, outras condições clínicas estudadas no campo das Terapias Avançadas, pressupõem também o desejo de obtenção de melhora em qualidade de vida.

Europa e Estados Unidos publicaram regulamentações sobre os produtos de terapias avançadas, em inglês, *Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP)*, em meados dos anos 2000, respectivamente: *Regulation (EC) n. 1394/2007 of the European Parliament and of the Council*⁴ e *Cellular & Gene Therapy Guidance Documents* publicados pela *Food and Drug Administration (FDA)*⁵. Segundo estas normas, os produtos de terapias avançadas consistem em três categorias: os produtos de terapia celular avançada, os produtos de engenharia tecidual e os produtos de terapia gênica.

Em âmbito nacional, de acordo com as definições descritas na Consulta Pública nº 270, de 04 de novembro de 2016, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) - Proposta de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) que dispõe sobre as Boas Práticas em Células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica⁶ -, os produtos de terapias avançadas, oriundos de substâncias humanas submetidas a manipulação extensa, possuem a finalidade de obter propriedades terapêuticas ou preventivas, por meio de seus modos de ação principais de naturezas metabólicas, farmacológicas e/ou imunológicas, para uso em humanos. Por manipulação extensa entende-se o processamento das células - como, por exemplo, o cultivo em laboratório com o objetivo de expansão ou diferenciação - com potencial de alterar qualquer de suas características biológicas relevantes, dentre as quais se inclui estado de diferenciação e ativação, potencial de proliferação e atividade metabólica.

Com os objetivos de inserção no campo das pesquisas com células-tronco e de mudança na condição de país meramente absorvedor de tecnologia para país produtor de inovação tecnológica, o Brasil deu passos iniciais importantes:

- Em março de 2005, mediante a promulgação da Lei nº 11.105, de 24 de março (Lei de Biossegurança)⁷, passou a dispor de uma regulamentação que, entre diversas outras providências, permitiu, em seu art. 5º, a utilização de células-tronco embrionárias (CTE) humanas para fins de pesquisa e terapia. Em novembro do mesmo ano, a Lei de Biossegurança foi regulamentada pelo Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005, conferindo à Anvisa a atribuição de estabelecer normas para coleta, processamento, teste, armazenamento,

transporte, controle de qualidade e uso das CTEs. O art. 5º da Lei nº 11.105/2005 foi objeto de questionamento por meio da Ação Direta de Inconstitucionalidade (ADI) nº 3.510/DF⁸, julgada improcedente por maioria, nos termos do voto do Relator, o Exmo. Sr. Ministro Carlos Ayres Britto. Em julgamento emblemático, entendeu o Supremo Tribunal Federal (STF) que, embora haja vida no embrião congelado, essa ainda não seria tutelável pelo Estado na mesma dimensão da vida humana do nativo. Declarou o STF, assim, a constitucionalidade do art. 5º referido, pois o preceito confirmaria o contido nos artigos 199 e 218, §1º da Constituição Federal, de 1988 (CF/88), permitindo que a ciência trabalhe em benefício da saúde humana.

- Em 2008, o governo federal iniciou os investimentos financeiros no setor através da criação e estruturação da Rede Nacional de Terapia Celular (RNTC) e, a partir de 2010, vem realizando um fomento setorial robusto nas áreas de terapia celular e medicina regenerativa, por meio do Departamento de Ciência e Tecnologia (Decit) do Ministério da Saúde, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) - em parceria com o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) do Ministério da Educação e, ainda, o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES). No total o governo federal já direcionou cerca de R\$ 120 milhões para infraestrutura, pesquisas científicas realizadas pelos setores público e privado e para a formação de recursos humanos altamente qualificados para a área⁹.
- Em 2011, foram publicadas a RDC da Anvisa nº 9, de 14 de março, que dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular (CTCs)¹⁰, a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 441, de 12 de maio, que aprovou as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano¹¹, e a Portaria do Ministério da Saúde nº 2.201, de 14 de setembro, que estabelece as diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano com finalidade de pesquisa¹².

Diante do fomento no setor, tanto de caráter público governamental como de caráter privado, algumas empresas, especialmente multinacionais que possuem produtos de terapias avançadas registrados e atualmente comercializados em países estrangeiros¹³, mostraram interesse em disponibilizar tais estratégias terapêuticas no mercado nacional brasileiro. Nesse cenário é presumível a premência do retorno financeiro para sustentar o aporte em pesquisa e tecnologia dispendido para o desenvolvimento dos referidos produtos.

Iniciaram-se, assim, as discussões entre os diversos setores envolvidos - acadêmico, empresarial e governamental - relacionadas à eventual descontinuidade dos investimentos nacionais e estrangeiros em virtude do entendimento, até então predominante, de que a regra contida na parte final do §4º do art. 199



da CF/88 constituiria óbice à comercialização dos produtos de terapias avançadas, e, *a fortiori*, ao seu registro sanitário nos termos da Lei n° 6.360, de 23 de setembro de 1976¹⁴.

Levantou-se a eventual impossibilidade de comercialização e a insegurança jurídica devido à ausência de um arcabouço regulatório específico que tratasse do tema, em contraposição à regulamentação internacional em vigência. Alegou-se, ainda, a previsibilidade de um possível esvaziamento do interesse no desenvolvimento de novas tecnologias no setor e a dificuldade para a esfera pública em prosperar e se manter ativa de forma robusta sem a dependência de investimentos contínuos de caráter governamental. Tais entraves resultariam na escassez de acesso a tratamentos terapêuticos inovadores que poderiam beneficiar a população brasileira e manteriam o Brasil na sua condição primordial de país dependente, meramente absorvedor de tecnologia.

Em face do exposto, foi encaminhada à Procuradoria Federal junto à Anvisa a consulta sobre uma possível releitura do dispositivo constitucional, com o objetivo de aliviar a efetiva conformidade jurídica permeada pela conjuntura apresentada e para que fosse possível dar início, em concordância com o ordenamento jurídico pátrio, à proposição e à elaboração de marco regulatório sobre o tema. A consulta levou em conta, igualmente, e sem perder de vista, os riscos envolvidos no uso de novas tecnologias e a finalidade institucional da Anvisa - como coordenadora do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) - de promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados¹⁵. A resposta à consulta direcionada à Procuradoria Federal junto à Anvisa foi expressa no Parecer Cons. n° 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU¹⁶, sendo, no presente artigo, exposta em seus pormenores ao longo da Discussão e Conclusão.

DISCUSSÃO

Do inteiro teor do Parecer Cons. n° 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU, compilam-se a seguir os principais aspectos de sua fundamentação que embasam as respectivas conclusões.

Constituição como “organismo vivo”¹⁷

Para compreensão do sentido e do alcance da regra estatuída no art. 199, §4°, da CF/88, revelam-se necessárias algumas observações preliminares sobre o conceito de Constituição.

José Afonso da Silva parte da noção de Constituição como:

um sistema de normas jurídicas, escritas ou costumeiras, que regula a forma do Estado, a forma de seu governo, o modo de aquisição e o exercício do poder, o estabelecimento de seus órgãos, os limites de sua ação, os direitos fundamentais do homem e as respectivas garantias. Em síntese, a constituição é o conjunto de normas que organiza os elementos constitutivos do Estado.

Essa ideia clássica de Constituição, todavia, sofreu muitas críticas, conforme anota o próprio José Afonso da Silva, por expressar apenas parte de seu conceito, “porque a toma como algo desvinculado da realidade social, quando deve ser concebida como uma estrutura normativa, uma conexão de sentido, que envolve um conjunto de valores”. Destarte, após brevíssima análise das teorias desenvolvidas por Hans Kelsen (sentido jurídico), Ferdinand Lassale (sentido sociológico) e Carl Schmitt (sentido político), conclui o renomado doutrinador brasileiro:

Busca-se, assim, formular uma concepção estrutural de constituição, que a considera no seu aspecto normativo, não como norma pura, mas como norma em sua conexão com a realidade social, que lhe dá o conteúdo fático e o sentido axiológico. Trata-se de um complexo, não de partes que se adicionam ou se somam, mas de elementos e membros que se enlaçam num todo unitário. O sentido jurídico de constituição não se obterá, se a apreciarmos desgarrada da totalidade da vida social, sem conexão com o conjunto da comunidade. Pois bem, certos modos de agir em sociedade transformam-se em condutas humanas valoradas historicamente e constituem-se em fundamento do existir comunitário, formando os elementos constitucionais do grupo social, que o constituinte intui e revela como preceitos normativos fundamentais: a Constituição.

A Constituição é algo que tem, como forma, um complexo de normas (escritas ou costumeiras); como conteúdo, a conduta humana motivada pelas relações sociais (econômicas, políticas, religiosas etc.); como fim, a realização dos valores que apontam para o existir da comunidade; e, finalmente, como causa criadora e recriadora, o poder que emana do povo. Não pode ser compreendida e interpretada, se não se tiver em mente essa estrutura, considerada em conexão de sentido, como é tudo aquilo que integra um conjunto de valores. Isso não impede que o estudioso dê preferência a dada perspectiva. Pode estudá-la sob o ângulo predominantemente formal, ou do lado do conteúdo, ou dos valores assegurados, ou da interferência do poder¹⁸.

Na mesma linha, Uadi Lammêgo Bulos assevera que “as constituições são lídimos organismos vivos, verdadeiros documentos abertos no tempo, em íntimo vínculo dialético com o meio circundante e com as forças de transformação da sociedade”¹⁷. Sem destoar, afirma Anna Cândida da Cunha Ferraz que “a Constituição enquanto conjunto de normas não se afasta, contudo, do substrato social que lhe dá vida, nem do sistema de valores que a norma pretende realizar”. E, ainda, faz referência a Karl Loewenstein quando explica que:

cada Constituição, quando nasce, integra apenas o momento, isto é o *status quo* existente no momento de seu nascimento, não podendo prever todo o futuro; na melhor das hipóteses, pode tentar levar em conta necessidades futuras, por meio de disposições e mecanismos cuidadosamente colocados, embora uma formulação demasiado elástica possa prejudicar a segurança jurídica¹⁹.



Portanto, infere-se que, embora a Lei Fundamental reflita os objetivos perseguidos pelo povo no momento em que é posta, a partir de sua promulgação, passa a sofrer a influência de novos valores que vão sendo incorporados à sociedade. Vale dizer, a realidade constitucional é constantemente afetada pelas alterações de padrões éticos, econômicos e políticos decorrentes da evolução tecnológica, científica e nas relações sociais. Nesse sentido, inegável que os progressos obtidos na medicina, notadamente as moderníssimas tecnologias de Terapias Avançadas, são capazes de ocasionar impactos no campo constitucional.

Consequentemente, a conciliação da realidade política e social com a realidade jurídica demanda a constante atualização das normas da carta magna, como ferramenta de sobrevivência e reavivamento de sua força normativa, seja por meio de reformas constitucionais, seja pelos processos informais de alteração constitucional, por muitos denominados de mutação constitucional.

A mutação constitucional permite a evolução harmônica e progressiva da Constituição, conferindo renovada acepção ao texto constitucional, sem contrariá-lo. Para maior compreensão, recorre-se ao escólio de Anna Cândida da Cunha Ferraz:

Assim, em síntese, mutação constitucional altera o sentido, o significado e o alcance do texto constitucional sem violar-lhe a letra e o espírito. Essa a característica fundamental da noção de mutação constitucional que merece, por ora, ser ressaltada. Trata-se, pois, de mudança constitucional que não contraria a Constituição, ou seja, que indireta ou implicitamente, é acolhida pela Lei Maior.

Tais alterações constitucionais, operadas fora das modalidades organizadas de exercício do poder constituinte instituído ou derivado, justificam-se e tem fundamento jurídico: são, em realidade, obra ou manifestação e uma espécie inorganizada de Poder Constituinte, o chamado poder constituinte difuso, na feliz expressão de Burdeau.

Esta a segunda característica a ser apontada.

Destina-se a função constituinte difusa a completar a constituição, a preencher vazios constitucionais, a continuar a obra do constituinte. Decorre diretamente da Constituição, isto é, seu fundamento flui da Lei Fundamental, ainda que implicitamente, de modo difuso e inorganizado.

É uma decorrência lógica da Constituição, na medida em que esta é uma obra que nasce para ser efetivamente aplicada, sobretudo naquilo que tem de essencial, e o essencial, por vezes, é incompleto, exigindo atuação ulterior, capaz de defini-lo, precisá-lo, resolver-lhes as obscuridades, dar-lhe continuidade e aplicação, sem vulnerar a obra constitucional escrita.

Como exercício de função constituinte implícita, é forçosamente limitada. Seus limites são necessariamente mais amplos e definidos do que os limites que se impõem ao constituinte derivado, isto é, ao poder de reforma constitucional, na medida em que, com permissão

expressa da Constituição, atua precisamente para reformá-la, emendá-la, modificando o texto e o conteúdo constitucional. O poder constituinte difuso, porque não expressamente autorizado, porque nasce de modo implícito e por decorrência lógica, não pode reformar a letra e o conteúdo expresso da Constituição. Sua atuação se restringe a precisar ou modificar o sentido, o significado e o alcance, sem todavia vulnerar a letra constitucional¹⁹.

Uadi Lammêgo Bulos não discrepa, afirmando que:

as constituições, como organismos vivos que são, acompanham o evoluir das circunstâncias sociais, políticas, econômicas, que, se não alteram o texto na letra e na forma, modificam-na na substância, no significado, no alcance e no sentido de seus dispositivos¹⁷.

Calha observar que os limites materiais impostos ao poder constituinte reformador se aplicam ao chamado poder constituinte difuso. Na realidade, para os processos informais de alteração constitucional há de se entender tais limites de uma forma ainda mais ampla, de modo a se evitar a violação do espírito da constituição, o esvaziamento de sua força normativa e a corrosão do Estado Democrático de Direito.

Inobstante a ausência de consenso doutrinário na sistematização dos processos informais de alteração da constituição, certo é que mais frequentemente se elenca a interpretação constitucional como seu principal mecanismo de atuação.

Moderna hermenêutica constitucional

Todo ato normativo estabelece regras gerais e abstratas, cabendo ao aplicador do direito interpretá-las, determinando seu significado e alcance em cada caso concreto. A Constituição, enquanto “Lei das Leis”, não está imune à interpretação. Ao revés, por não ser composta de arquétipos tradicionais do tipo “ocorrência da hipótese - consequência jurídica”, mas primordialmente de formulações sobre bens jurídicos e valores fundamentais, sua exegese é imprescindível e extremamente complexa, demandando maior esforço hermenêutico. Alexandre de Moraes afirma que:

a Constituição Federal há de ser sempre interpretada, pois somente por meio da conjugação da letra do texto com as características históricas, políticas, ideológicas do momento, se encontrará o melhor sentido da norma jurídica, em confronto com a realidade sociopolítico-econômica e almejando sua plena eficácia²⁰.

Ainda, conforme aduz Uadi Lammêgo Bulos,

nenhum texto constitucional dispensa interpretação, sob pena de não adaptarmos o dever ser de suas normas ao influxo dos acontecimentos sociais, históricos, políticos, religiosos e econômicos, presentes num determinado momento. Extrair as finalidades supremas dos preceitos constitucionais, tornando-os efetivos e harmônicos entre si, é a palavra de ordem na exegese das constituições¹⁷.



Assim, a interpretação representa muito mais do que um mero pressuposto para a aplicação das normas constitucionais, mas, antes, desempenha uma importante função na constante renovação da ordem jurídica, a fim de acolher, dentro dos limites formais e materiais traçados pelo constituinte originário, os novos influxos sociais.

Nesse diapasão, o surgimento das Terapias Avançadas impõe indagações que conduzem à necessidade de uma profunda e revigorada leitura do §4º do art. 199 da CF/88, a fim de interpretá-lo evolutivamente, em diálogo com o atual contexto significativamente marcado pelo desenvolvimento científico e, conseqüentemente, social.

No desempenho de tal mister, além dos elementos hermenêuticos clássicos, entre os quais se destaca, para o presente debate, o teleológico e o lógico-sistemático - que entende a constituição como um sistema lógico e coordenado de princípios e regras, que devem guardar coerência entre si -, há de se levar em conta os métodos modernos de interpretação constitucional, quais sejam: a) tópico-problemático, que parte de um problema concreto para a norma, atribuindo-se à interpretação um caráter prático na busca da solução dos problemas concretizados; b) hermenêutico-concretizador, que parte da constituição para o problema, valendo-se das pré-compreensões do intérprete sobre o tema; c) científico-espiritual, que analisa a norma constitucional de forma elástica e flexível, para acompanhar o dinamismo das relações sociais, em constante transformação; d) normativo-estruturante, que busca a criação de uma norma para cada conflito, inexistindo identidade entre a norma e o texto normativo; e e) comparação constitucional, que alia os elementos da hermenêutica tradicional ao direito comparado.

Também devem ser considerados os princípios comumente apontados pelos doutrinadores, a saber: a) princípio da unidade da constituição, segundo o qual as normas constitucionais não devem ser vistas de maneira isolada, mas sim interpretadas em sua globalidade para evitar contradições; b) princípio da concórdia prática ou da harmonização, que considera que os bens jurídicos constitucionais deverão existir de forma harmônica, na hipótese de eventual conflito entre eles, buscando assim evitar o sacrifício de um princípio em detrimento a outro; c) princípio da eficácia integradora ou do efeito integrador, que prioriza a integração política e social do Estado, levando o intérprete a desenvolver um raciocínio crítico e global da constituição, para dela extrair a verdadeira finalidade de suas normas; d) princípio da máxima efetividade, cujo objetivo é imprimir a mais ampla efetividade social à norma constitucional, extraindo-lhes o maior conteúdo possível, especialmente em matéria de direitos humanos fundamentais; e) princípio da Interpretação conforme a constituição, segundo o qual, diante de normas que possuem mais de uma interpretação, deve ser dada preferência àquela que mais se aproxima com a interpretação constitucional; e f) princípio da razoabilidade e da proporcionalidade, que aduz que as normas devem ser interpretadas seguindo critérios de equidade, bom senso, ideias de justiça, prudência e moderação.

Na utilização conjugada dos elementos, métodos e princípios supramencionados, afigura-se essencial ultrapassar a literalidade do §4º do art. 199 da CF/88 e atingir os princípios constitucionais

a ele diretamente relacionados, pois sintetizam os valores plasmados no ordenamento jurídico, verdadeiros vetores ou paradigmas interpretativos que conferem unidade e harmonia ao sistema, requerendo que se lhes dê cada vez maior concreção. Não há como negar sua relevância na interpretação e aplicação das normas de qualquer natureza, inclusive das próprias regras constitucionais. É nos princípios que reside a justificação valorativa das regras, servindo para operacionalizar sua interpretação e, conseqüentemente, sua adequação aos casos concretos.

Os princípios constitucionais são como luzes para a exegese constitucional, provendo o intérprete de elementos axiológicos para uma interpretação razoável capaz de conferir uma lógica sistêmica ao ordenamento constitucional²¹. Sem dúvida, representam a objetivação de certos valores sociopolíticos existentes quando da formalização jurídica do direito constitucional pelo poder constituinte e, por isso, refletem nos procedimentos de interpretação da Lei Fundamental, sendo responsáveis pela estabilização do texto constitucional. Noutros termos, pode-se dizer que, em função da necessidade de permanência, a constituição possui um caráter principiológico que reveste a maioria de suas normas, permitindo a atualização de seus ditames em face das alterações que ocorrem na sociedade. Portanto, os princípios constitucionais servem como fundamento de legitimidade à ordem jurídica da sociedade, possuindo, assim, função hermenêutica, supletiva e argumentativa.

Não se está aqui dizendo que a principiologia permitirá que se possa dizer “qualquer coisa sobre qualquer coisa”, mas sim que, entre várias interpretações possíveis de uma norma, há de prevalecer daquela que melhor atenda à concretização e realização de tais princípios, de forma a contribuir para a manutenção da integridade e coerência do marco normativo.

Logo, pergunta-se: o que se pretende proteger com a proibição contida na parte final do §4º do art. 199? Quais princípios fundamentais residem na origem da declinada regra constitucional e como lhes imprimir a maior efetividade possível? Quais os bens jurídicos envolvidos e como conciliá-los de forma harmônica?

Inegavelmente, o que anima a regra em análise, ou seja, o que lhe dá razão de ser, é a proteção à dignidade da pessoa humana, da qual decorrem os direitos fundamentais à vida e à saúde. Essa é a diretriz principiológica concretizada no §4º do art. 199 da CF/88, que deve informar a interpretação do dispositivo e orientar a elaboração de futuros e eventuais atos regulamentares sobre a matéria.

Interpretação do §4º do art. 199 da CF/88 com base no princípio fundamental da dignidade da pessoa humana e nos direitos fundamentais à vida e à saúde

A Constituição Federal de 1988, em seu art. 1º, III, galgou o reconhecimento e a consideração da dignidade da pessoa humana à condição de princípio fundamental do Estado Democrático de Direito, vinculante para todas as ações do Estado e para a vida em sociedade. E, nessa toada, funciona como critério de interpretação e integração, conferindo coerência geral ao ordenamento constitucional.



O valor dignidade possui múltiplas dimensões, razão pela qual há grande dificuldade de se delimitar os contornos de seu conceito. Para Guilherme Wunsch, o princípio da dignidade da pessoa humana constitui uma cláusula geral de tutela do ser humano, representado pelo valor da pessoa, que deve ser tutelado sem limites, à exceção do interesse de outras pessoas humanas²². José Afonso da Silva, a seu turno, classifica a dignidade da pessoa humana como um valor supremo que atrai o conteúdo de todos os direitos fundamentais¹⁸.

Alexandre de Moraes caminha no mesmo sentido ao afirmar que o fundamento dignidade da pessoa humana concede unidade aos direitos e garantias fundamentais, explicando tratar-se de:

um valor espiritual e moral inerente à pessoa, que se manifesta singularmente na autodeterminação consciente e responsável pela vida e que traz consigo a pretensão ao respeito por parte das demais pessoas, constituindo-se um mínimo invulnerável que todo estatuto jurídico deve assegurar, de modo que, somente excepcionalmente, possam ser feitas limitações ao exercício dos direitos fundamentais, mas sempre sem menosprezar a necessária estima que merecem todas as pessoas enquanto seres humanos²⁰.

Do exposto acima, extrai-se claramente que a regra estatuída no §4º do art. 199 da CF/88 tem como suporte axiológico o princípio da dignidade da pessoa humana, para o qual o ser humano não é objeto de direito, mas sim um valor considerável em si mesmo. Com a proibição de práticas como a comercialização de órgãos, tecidos, sangue, esperma e demais substâncias humanas, protege-se brasileiros e estrangeiros residentes no País da mercantilização do corpo humano. Essa é a *mens legis* que se apura em uma interpretação teleológica do dispositivo.

Além disso, cumpre registrar que o constituinte originário, embora, possivelmente vislumbrasse margem aos progressos no campo da biotecnologia, o que se deduz do próprio texto do §4º do art. 199 (“§ 4º A lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento...”), não tinha como sequer imaginar que tais pesquisas desvendariam o enorme potencial da terapia celular e a elevariam ao patamar de novo paradigma da medicina na atualidade, uma vez que a primeira linhagem de células-tronco humanas embrionárias só foi desenvolvida pelo pesquisador James A. Thomson, em 1998²³.

Ocorre que a era da biotecnologia se impôs de modo irreversível, trazendo muitas expectativas de conquistas aplicáveis à cura de doenças crônicas graves ou à melhoria da qualidade de vida humana. E se mostra forçosa a evolução das categorias jurídicas diante dos avanços científicos, sob pena de se criar um enorme descompasso entre os anseios sociais e o direito, o que enfraqueceria a força normativa da constituição.

Fixadas tais premissas, o prosseguimento da presente análise depende da seguinte reflexão: afigura-se razoável para a concretização do princípio da dignidade da pessoa humana por meio da regra estatuída na parte final do §4º do art. 199 da CF/88,

além de impedir a captação remunerada de órgãos, tecidos, sangue etc., proibir também o comércio de produtos de terapias avançadas, produzidos em laboratório mediante manipulação extensa, com emprego de modernas e elaboradas tecnologias, a partir de ou utilizando partes de células, tecidos e genes humanos, obtidos originalmente por meio de disposição gratuita em vida ou *post mortem*?

A resposta é negativa. Se antes era plenamente justificável uma interpretação absoluta do §4º do art. 199 da CF/88 - até porque inexistiam perspectivas de se criar produtos a partir de substâncias humanas de tamanha repercussão na saúde de um enorme contingente de pessoas -, hoje se afigura desacertada uma exegese que impeça *a priori* a comercialização de soluções terapêuticas derivadas de ou que contenham substâncias humanas (desde que obtidas originalmente por doação em vida ou *post mortem*), na medida em que tal proibição limitaria e atrasaria substancialmente o desenvolvimento de produtos biotecnológicos, reduzindo a oferta de tais alternativas de promoção e proteção à saúde da população, em contrariedade ao disposto nos artigos 6º e 196 e seguintes da CF/88, que tratam do direito fundamental à saúde e, em última instância, vulnerando o próprio princípio da dignidade da pessoa humana.

De fato, proibir a comercialização de “medicamentos” ou “produtos” desenvolvidos a partir de matéria-prima humana (gratuitamente captada, ressalte-se), restringiria esse setor de assistência à saúde exclusivamente ao Estado, afastando a iniciativa privada, cujo objetivo é a obtenção de lucro, do investimento em estudos. E, certamente, quanto menos frentes de pesquisa se abrirem, menor será a disponibilidade de tratamentos e maior será o prazo em que se tornarão acessíveis para a população. Calha atentar, no particular, que o *caput* do dispositivo em tela dispõe textualmente que “a assistência à saúde é livre à iniciativa privada”. Não faz sentido, pois, entender o seu §4º de forma tão rígida que inviabilize a assistência à saúde pela iniciativa privada com relação à oferta de produtos biotecnológicos, mormente quando se leva em conta o direito à saúde, concebido de forma ampla e universal, como uma das facetas do mesmo princípio da dignidade da pessoa humana.

Observa-se, pois, que um dos aspectos do princípio fundamental da dignidade da pessoa humana pode ser traduzido na garantia de respeito à integridade psicofísica do ser humano. Tal viés impede que se descaracterize o ser humano como sujeito de direitos a ponto de se permitir a “venda” de partes de seu corpo, o que justifica a proibição estatuída no §4º do art. 199 da CF/88. Entretanto, ao mesmo tempo, dele decorre o direito social fundamental à saúde, que impõe ao Estado atuação direta e incentivo/regulação da iniciativa privada para prestação de serviços que conduzam à efetiva promoção da saúde, bem-estar e vida digna dos seres humanos, da forma mais ampla e universal possível.

A “saúde” (à qual se dedica integralmente a Seção II, do Capítulo II, do Título VIII, da CF/88, onde se situa o próprio art. 199) é reconhecida, no art. 6º, como direito social de natureza fundamental, e, no art. 194, como o primeiro dos direitos da seguridade social. Nos termos do art. 196,



a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação.

Ainda prescreve o art. 197 que:

são de relevância pública as ações e serviços de saúde, cabendo ao Poder Público dispor, nos termos da lei, sobre sua regulamentação, fiscalização e controle, devendo sua execução ser feita diretamente ou através de terceiros e, também, por pessoa física ou jurídica de direito privado.

A saúde é um pressuposto para a qualidade de vida e dignidade humana de qualquer pessoa. Sem saúde não há que se falar em direito à vida, sequer em dignidade humana, uma vez que estará o ser humano incapacitado de usufruir de sua vida tal qual deseja. Em outros termos, o princípio da dignidade da pessoa humana impõe ao Estado, além do dever de respeito e proteção, a obrigação de promover as condições que viabilizem e removam todo tipo de obstáculos que estejam impedindo as pessoas de viverem com dignidade.

Como sabido, milhares de brasileiros sofrem de patologias e consequências de traumas que reduzem significativamente sua qualidade de vida, impedindo-os de usufruir de uma vida digna (alguns tipos de câncer, doenças neurológicas como Parkinson, injúrias na medula espinhal, diabetes, doenças cardíacas e outras). Para eles, os resultados já divulgados das pesquisas com células-tronco trazem um alento, uma esperança de melhoria de sua saúde.

Diante desse quadro, considerar o §4º como proibitivo constitucional aplicável ao comércio de produtos de terapias avançadas representaria um substancial entrave ao pleno exercício do amplo e universal direito fundamental à saúde, que comporta para o Estado, repita-se, além do dever de atuar diretamente no desenvolvimento de produtos biotecnológicos, também a obrigação de fomentar e regulamentar o desempenho da iniciativa privada nessa seara.

Saliente-se, ademais, que a melhor interpretação do texto constitucional não prescinde da análise sistêmica do ordenamento. Nesse contexto, importante invocar os arts. 218 e 225 da CF/88. Verifica-se, pois, que o art. 218 da CF/88 atribui ao Estado a incumbência de não apenas promover, como também a de incentivar a iniciativa privada a desenvolver pesquisas, em caráter prioritário, visando ao progresso científico da humanidade e melhoria das condições de vida para todos. Além disso, o art. 225 da CF/88 assegura o direito social fundamental do homem ao meio ambiente ecologicamente equilibrado e estabelece o princípio da solidariedade entre as gerações, a fim de garantir a dignidade da existência humana, competindo ao Estado atuar de modo a assegurar sua efetividade.

No julgamento da já mencionada ADI nº 3.510/DF, por meio da qual se impugnou em bloco o art. 5º da Lei nº 11.105/2005 (Lei da Biossegurança), o STF ponderou que, embora não possa

haver produção de embriões com intuito de obter células-tronco para fins de pesquisa - pois em tal situação o embrião seria instrumentalizado desde o início, o que representaria uma grave lesão à dignidade da pessoa humana - uma vez respeitados os requisitos positivados, tidos como razoáveis e proporcionais em face dos bens jurídicos envolvidos, poderia o embrião congelado cientificamente categorizado como inviável, subsequentemente, ser aproveitado para obtenção de células-tronco. Nessa toada, a escolha legislativa, longe de significar um desprezo pela vida humana (do embrião), denota, em verdade,

uma mais firme disposição para encurtar os caminhos que possam levar à superação do infortúnio alheio. Isto no âmbito de um ordenamento constitucional que desde o seu preâmbulo qualifica 'a liberdade, a segurança, o bem-estar, o desenvolvimento, a igualdade e a justiça' como valores supremos de uma sociedade mais que tudo 'fraterna'. O que já significa incorporar o advento do constitucionalismo fraternal às relações humanas, a traduzir verdadeira comunhão de vida ou vida social em clima de transbordante solidariedade em benefício da saúde e contra eventuais traumas do acaso e até dos golpes da própria natureza⁸.

Em seu voto, a Exma. Sra. Ministra Carmem Lúcia salientou que o princípio da dignidade da vida humana há de ser observado não apenas quanto ao embrião, do qual se obteria a célula-tronco embrionária, mas também em relação àqueles acometidos de infortúnios que impediriam o viver com saúde e dignidade.

Um acurado olhar sobre o inteiro teor do emblemático julgamento demonstra que a mais alta Corte do País aceitou o desafio de interpretar as disposições da Magna Carta evolutivamente, de forma coerente, prudente e equilibrada, resignificando o ordenamento constitucional para enfrentar e acolher as grandes questões da modernidade.

CONCLUSÕES

A compreensão da Constituição Brasileira, enquanto organismo vivo, cujo significado e alcance deve se ajustar à dinâmica social e política, válida e reforça a inferência do Parecer Cons. nº 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU de que o enunciado constante na parte final do §4º do art. 199, considerando-se a evolução da ciência e os novos métodos de tratamento de doenças e de promoção da saúde surgidos após sua promulgação em 1988, merecia ser reapreciado, interpretado e, assim, atualizado, de modo a permitir a concreta realização da norma constitucional, a fim de manter sua força normativa.

Desta feita, por meio da investigação empreendida no Parecer Cons. nº 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU, concluiu-se que a justificação valorativa da regra disposta na parte final do §4º do art. 199 da CF/88 reside na dignidade da pessoa humana, princípio fundamental do Estado Democrático de Direito, valor supremo do qual decorrem os direitos fundamentais à vida e à saúde. Por tal motivo, não poderia o dispositivo em questão sofrer interpretação absoluta que impusesse obstáculos desproporcionais à efetiva concretização do direito à saúde de forma ampla e



universal, sob pena de se vulnerar o próprio princípio da dignidade da pessoa humana.

Assim, defendeu-se no Parecer Cons. n° 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU que o princípio fundamental da dignidade da pessoa humana seja atendido mediante exegese teleológica, sistemática e integrativa do §4º do art. 199 da CF/88 segundo a qual a captação ou a obtenção da matéria humana deve decorrer sempre de disposição voluntária e altruísta, sem que isso implique categorizar aprioristicamente como bens fora do comércio os medicamentos ou produtos obtidos em laboratório por meio de manipulação extensa, com emprego de modernas tecnologias, a partir de ou utilizando substâncias humanas, obtidas originalmente por meio de doação em vida ou *post mortem*.

Considerando que a conclusão pela possibilidade de registro junto à Anvisa e comercialização de produtos de terapias avançadas

pauta-se no princípio da dignidade da pessoa humana, advertiu-se no Parecer Cons. n° 12/2016/PF-Anvisa/PGF/AGU que tais produtos só merecem o amparo do ordenamento jurídico se e enquanto servirem para promover a saúde, o bem-estar e, conseqüentemente, a vida digna, sem rebaixar os seres humanos à condição de objetos a serem mercantizados.

Assim, frisou-se a imprescindibilidade de se construir um arcabouço normativo infraconstitucional rigoroso para garantir que as substâncias humanas a serem empregadas na fabricação dos produtos de terapias avançadas sejam captadas gratuitamente, por doação livre, espontânea e informada, de modo a afastar o risco de qualquer abuso. Ainda considerou-se necessário o estabelecimento de regras para delimitar os pressupostos e requisitos para manipulação de substâncias humanas e sua transformação em produtos com finalidade terapêutica, a serem comercializados com o propósito de dignificação da vida daqueles que possam ser por eles tratados¹⁶.

REFERÊNCIAS

1. Blum HE et al. Advances in individualized and regenerative medicine. *Adv Med Sci.* 2014; 59(1):7-12. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2013.12.001>
2. Pereira LV. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Cienc Saúde Coletiva.* 2008;13(1):7-14. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000100002>
3. U.S. Department of Health & Human Services. National Institutes of Health. Stem Cell Information. Stem cell basics. Bethesda: National Institutes of Health; 2016[acesso 13 out 2017]. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics.htm>
4. European Union. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) N° 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending. 2007[acesso 13 out 2017]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:0137:en:PDF>
5. U.S. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration - FDA. Center for Biologics Evaluation and Research - CBER. Cellular & Gene Therapy Guidance Documents. [acesso em: 13 out 2017]. Disponível em: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/default.htm>
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Consulta Pública N° 270, de 4 de novembro de 2016. Proposta de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) que dispõe sobre as Boas Práticas em Células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica. *Diário Oficial União.* 8 nov 2016.
7. Brasil. Lei N° 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, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 28 mar 2005.
8. Supremo Tribunal Federal. Ação Direta de Inconstitucionalidade n° 3.510/DF. Julgamento em 3 de março de 2008. *Diário Oficial Justiça.* 28 maio 2010.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Seminário Nacional sobre regulação em terapias celulares: relatório. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2012[acesso 08 fev 2018]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/4048533/4048662/Relat%C3%B3rio+Semin%C3%A1rio+Nacional+sobre+Regula%C3%A7%C3%A3o+em+Terapias+Celulares+2012.pdf/441d6abe-e5b1-4f07-b898-95d4fe580ecc>
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 9, de 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 16 mar 2011.
11. Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS N° 441, de 12 de maio de 2011. Aprova as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. *Diário Oficial União.*
12. Ministério da Saúde (BR). Portaria N° 2.201, de 14 de setembro de 2011. Estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa. *Diário Oficial União.* 15 set 2011.
13. U.S. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration - FDA. Office of Tissues and Advanced Therapies (OTAT). Approved cellular and gene therapy products. Silver Spring: and Drug Administration; 2017[acesso em: 17 out 2017]. Disponível em: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/default.htm>



14. Brasil. Lei Nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial União. 24 set 1976
15. Brasil. Lei Nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial União. 27 jan 1999.
16. Brasil. Advocacia-Geral da União. Procuradoria-Geral Federal. Procuradoria Federal junto à Anvisa. Parecer Cons. n° 12/2016/PF-ANVISA/PGF/AGU. 31 mar. 2016.
17. Bulos UL. Curso de direito constitucional. 9ª ed. São Paulo: Saraiva; 2015.
18. Silva JA. Curso de direito constitucional positivo. 26ª ed. São Paulo: Malheiros; 2006.
19. Ferraz ACC. Processos informais de mudança da constituição: mutações constitucionais e mutações inconstitucionais. 2ª ed. Osasco: EdiFIEO; 2015.
20. Moraes A. Direito constitucional. 23ª ed. São Paulo: Atlas; 2008.
21. Sarmiento D. A ponderação de interesses na Constituição Federal. Rio de Janeiro: Lumen Juris; 2003.
22. Wünsch G. O corpo humano entre a (des)patrimonialização e a dignidade no acórdão Nicolas Perruche: questionamentos ao ordenamento jurídico contemporâneo. In: Engelmann W, coordenador. Sistemas jurídicos contemporâneos e constitucionalização do direito: releituras do princípio da dignidade humana. Curitiba: Juruá; 2013. p. 155-194.
23. Garcia FC. Responsabilidade civil e terapia celular humana na legislação brasileira. In: Meirelles JML, coordenador. Terapia celular humana: limites e possibilidades de ordem ética e jurídica. Curitiba: Juruá; 2010. p.75 - 104.

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.

Proposta de marco regulatório para os Produtos de Terapias Avançadas no Brasil

Proposal of regulatory framework for Advanced Therapy Medicinal Products in Brazil

Renata Miranda Parca

Marília Rodrigues Mendes Takao

João Batista da Silva Junior

RESUMO

Introdução: Os Produtos de Terapias Avançadas (PTA) têm sido a grande promessa terapêutica para o tratamento de diversas doenças, inclusive aquelas para as quais não existe alternativa disponível no mercado. Estes produtos, obtidos a partir de células humanas, foram categorizados em âmbito internacional como nova classe terapêutica para a qual a regulamentação adotada assemelha-se à dos medicamentos biológicos, embora com abordagem e critérios diferenciados devido às peculiaridades dos PTA. **Objetivo:** O presente artigo tem como objetivos descrever o histórico das discussões e regulamentações editadas para a temática e apresentar as perspectivas relacionadas ao desenvolvimento do marco regulatório brasileiro para esta nova categoria de produto, a fim de propiciar um ambiente regulatório estável e transparente, favorável ao desenvolvimento tecnológico em âmbito nacional, bem como ao fomento através de investimentos nacionais e internacionais. **Método:** O desenvolvimento deste artigo baseou-se na pesquisa do histórico de normativos sobre o tema, nas iniciativas regulatórias adotadas pela Anvisa, bem como na experiência dos autores a partir de participação em fóruns e discussões afetas à área. **Resultados:** Fundamentação do marco regulatório sanitário nacional para PTA a ser elaborado, e exposição dos principais aspectos da proposta. **Conclusões:** A proposta de marco regulatório nacional para os PTAs abará regulamentos para avaliação e aprovação de ensaios clínicos pela Anvisa, Certificação de Boas Práticas em Células para estabelecimentos produtores e registro de produtos.

PALAVRAS-CHAVE: Regulamentação; Centro de Processamento Celular; Produtos de Terapias Avançadas; Terapia Celular; Marco Regulatório

ABSTRACT

Introduction: Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) have been a therapeutic promise for the treatment of several diseases, including those for which there is no therapeutic alternative available on the market. These products, obtained from human cells, were categorized internationally as a new therapeutic class with similar approach as biological medicines, although with different criteria, due to their peculiarities. **Objective:** This article aims to describe the history of the discussions and regulations published for the thematic, and to present the perspectives related to the development of the Brazilian regulatory framework for this new category of product, with the objective of providing a stable and transparent regulatory environment, favorable to the technological development at national level, as well as to attract national and international investments in the field. **Method:** The development of this article was based on the research of the history of normative published about the topic, on the regulatory initiatives implemented by Anvisa as well as on the participation of the authors in forums and discussions towards the theme. **Results:** Basis of the national regulatory framework for PTA to be elaborated, and exposure of the main aspects of the proposal. **Conclusions:** The proposal of regulatory framework for ATMP will cover the regulations for evaluation and approval of clinical trials by Anvisa, Certification of Good Cell Practices for producer establishments and marketing authorization of products.

Agência Nacional de Vigilância
Sanitária (Anvisa), Brasília, DF, Brasil

* E-mail: renata.parca@anvisa.gov.br

Recebido: 26 out 2017
Aprovado: 31 jan 2018

KEYWORDS: Regulation; Cell Processing Center; Advanced Therapy Medicinal Products; Cell Therapy; Regulatory Framework



INTRODUÇÃO

A Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)¹, estabeleceu, dentre as competências da Agência, a atribuição de regulamentar, controlar e fiscalizar produtos e serviços que envolvam risco à saúde humana. Em seu art. 8º, a Lei considera bens e produtos sujeitos à vigilância sanitária aqueles que envolvam a possibilidade de risco à saúde pública incluindo os obtidos por meio de engenharia genética ou por outro procedimento relacionado. É neste contexto que se enquadram as terapias celulares para fins de pesquisa clínica ou uso terapêutico em humanos. A primeira Resolução sanitária publicada no país para regulamentar os critérios técnico-sanitários mínimos para funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, estabelecimentos responsáveis por disponibilizar células-tronco hematopoéticas para transplante, data do ano de 2003². Ainda nos dias atuais, este procedimento terapêutico, nominado popularmente como transplante de medula óssea, é o único tipo de terapia celular reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina (CFM).

Posteriormente, em 2005, com a publicação da Lei nº 11.105³, de 24 de março, o Brasil deu um importante passo no campo das terapias celulares. Foi aprovada, por meio desta Lei, a utilização de células-tronco embrionárias para fins de pesquisa e terapia, e o Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005⁴, que a regulamentou, atribuiu à Anvisa, em seu art. 65, a competência de criar normas para os procedimentos de coleta, de processamento, testagem laboratorial, armazenamento, transporte, controle de qualidade e uso de células-tronco embrionárias humanas. Esta atribuição, conferida à Anvisa, foi significativa para o início dos processos de discussão interna, no âmbito da Agência, relativos à necessidade de aprimoramento da regulamentação sobre as terapias celulares. Especialmente as terapias empregando células-tronco que, a partir de então, vinham sendo utilizadas em vários campos e diferentes abordagens em pesquisa básica, com perspectivas promissoras para o desenvolvimento de pesquisas clínicas e uso terapêutico, no Brasil e no mundo. Com destaque para as pesquisas nos campos da reparação do sistema nervoso central, do tratamento de doenças de naturezas genética, imunológica e metabólica, bem como restauração de tecidos e órgãos com lesões, além da promessa em torno das células pluripotentes induzidas⁵.

Em 2007, a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency - EMA*)⁶ e a Agência norte-americana de alimentos e medicamentos (*Food and Drug Administration - FDA*)⁷ publicaram suas principais regulamentações e guias para produção e controle dos denominados Produtos de Terapias Avançadas (PTA), que receberam essa denominação e foram enquadrados em uma nova classe terapêutica, não mais entendida como procedimento médico, mas sim como produto.

A regulamentação europeia^{6,8} enquadra os PTA em três categorias assim definidas:

a) Medicamentos de terapia com células somáticas, aqueles constituídos por células ou tecidos que possuem a finalidade de obter propriedades terapêuticas, preventivas ou

de diagnóstico, por meio de seu modo de ação principal de natureza metabólica, farmacológica e/ou imunológica, para uso autólogo ou alogênico em humanos, sendo que foram submetidos a manipulação extensa; e/ou desempenham no receptor função distinta da desempenhada no doador. Carticel® (cultura de condrócitos autólogos) configura um produto de terapia celular avançada atualmente aprovado pela EMA com indicação para reparo de defeitos sintomáticos de cartilagem, causados por traumas agudos ou repetitivos em pacientes que apresentaram resposta inadequada a artroscopia ou outros procedimentos.

b) Produtos de engenharia tecidual, constituídos por células organizadas em tecidos ou órgãos que apresentam propriedades que permitam regenerar, reconstituir ou substituir determinado tecido ou órgão humano, na presença ou não de suporte estrutural constituído por material biológico ou biocompatível, que tenham sido submetidos a manipulação extensa; e/ou desempenham no receptor função distinta da desempenhada no doador. Holoclar® é um produto de engenharia tecidual, também com registro vigente emitido pela EMA, que consiste em cultura de células epiteliais da córnea autólogas em matriz de fibrina, indicado para o reparo de danos da córnea.

c) Medicamentos de terapia gênica, *in vivo* ou *ex vivo*, definidos como aqueles que contêm substância ativa a qual inclui ou consiste em ácido nucleico recombinante, usado ou administrado no ser humano, tendo como objetivos a regulação, a reparação, a substituição, a adição ou a supressão de sequência genética. Seus efeitos terapêuticos estão relacionados com a sequência do ácido nucleico recombinante que contêm ou com o produto da expressão gênica dessa sequência. Exemplo de produto de terapia gênica é o Kymiriah®, células T autólogas geneticamente manipuladas, indicado para o tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda refratária ou de recaída.

Cabe ora destacar a diferença entre os conceitos de manipulação mínima e manipulação extensa de células^{6,8}. A manipulação mínima consiste em uma técnica de processamento das células ou tecidos que não altera de forma significativa as suas características biológicas, dentre as quais se incluem estado de diferenciação e ativação, o potencial de proliferação e a atividade metabólica. São consideradas técnicas de manipulação mínima os atos de cortar, separar, centrifugar, imergir ou preservar em soluções antibióticas, concentrar, purificar, filtrar, liofilizar, irradiar, congelar, criopreservar ou vitrificar, entre outros que atenderem à definição apresentada. O processamento de células-tronco para fins de transplante convencional é considerado ato de manipulação mínima de células. Já a manipulação extensa consiste no processamento de células e tecidos que altera qualquer de suas características biológicas, dentre as quais se incluem estado de diferenciação e ativação, potencial de proliferação e atividade metabólica. Neste contexto, todo tipo de cultivo celular é considerado manipulação extensa.



Este cenário - estruturado em 2007, quando as principais agências reguladoras internacionais assumiram as terapias celulares na lógica de produtos - não foi completamente implantado no Brasil, pois o entendimento jurídico nacional, considerado à época, adotou de forma absoluta o alcance da regra estatuída no art. 199, §4º, da Constituição Federal Brasileira de 1988⁹ sob a ótica da vedação de qualquer tipo de comercialização de órgãos, tecidos e partes do corpo humano, inclusive de produtos oriundos destes. Desta forma, as terapias celulares, no país, foram categorizadas pelos órgãos reguladores sob a mesma racionalidade de enquadramento do sangue para fins transfusionais e das células e dos tecidos para transplante convencional, isto posto, produtos não passíveis de registro sanitário. A regulamentação sanitária para estes produtos configurou-se, portanto, no estabelecimento de requisitos mínimos para o funcionamento dos estabelecimentos responsáveis pela seleção de doadores, coleta de células, processamento, armazenamento, controles laboratoriais, liberação para uso terapêutico e transporte do material biológico.

Em 2011, a Anvisa publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 9, de 14 de março de 2011, que dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular (CTC) para fins de pesquisa clínica e terapia¹⁰. Esta RDC foi fruto das discussões de um Grupo de Trabalho (GT) composto por especialistas na área de terapias celulares, formalmente nomeado pela Agência. O GT instituído contou com a participação de membros da Associação Brasileira de Terapia Celular (ABTCEL), membros da Anvisa e do Ministério da Saúde. A RDC nº 09/2011 estabeleceu, assim, os requisitos mínimos para a disponibilização de células pelos CTC, além de tornar mandatário o licenciamento sanitário destes estabelecimentos pelo órgão competente de Vigilância Sanitária. Além disso, em seu art. 7º, a RDC determinou que as células humanas só poderiam ser disponibilizadas para pesquisa clínica após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Sistema Comitê de Ética em Pesquisa/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP/Conep). Caso viessem a ser disponibilizadas para fins terapêuticos, as terapias deveriam ser reconhecidas pelo CFM ou pelo Conselho Federal de Odontologia (CFO), conforme aplicável. Desta forma, em 2011, a regulação sanitária determinou critérios de controle de qualidade e segurança das células, instituídas pela RDC nº 9/2011, embora a aprovação dos procedimentos para o uso terapêutico envolvendo as terapias celulares tenha sido mantida a cargo dos Conselhos Profissionais.

Ressalta-se que, conforme explicitado acima, tanto EMA quanto FDA, em 2007, já consideravam esta nova categoria terapêutica - os PTA - como produto, cujas pesquisas clínicas são passíveis de avaliação e de aprovação por parte das autoridades sanitárias, previamente ao seu início, assim como necessitam de aprovação e registro antes de serem disponibilizados para uso pela população.

Neste sentido, a participação da Anvisa em fóruns, reuniões e encontros internacionais voltados à discussão do tema "PTA", em especial, nos encontros do grupo de reguladores *Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S)*¹¹, desafiou o padrão regulatório instituído pelo Brasil, visto que o modelo

inicialmente adotado se encontrava completamente afastado dos modelos adotados pelas principais agências sanitárias internacionais. Além disso, empresas estrangeiras passaram a questionar a Agência sobre a possibilidade de avaliação de ensaios clínicos e de registro sanitário de produtos desta natureza.

Considerando essas discussões e o anseio de que o Brasil viesse a adotar um modelo regulatório que fosse minimamente harmonizado com a regulação internacional para os produtos e serviços afetos à vigilância sanitária, a Anvisa realizou também em 2011 o Seminário Nacional sobre Regulação em Terapias Celulares¹², com forte participação de representantes dos órgãos reguladores, dentre os quais o Ministério da Saúde, o Ministério de Ciências e Tecnologia, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e os Conselhos Profissionais, de Associações, de Universidades e do setor regulado. Este Seminário teve como objetivo principal promover a discussão ampliada e democrática acerca dos diversos aspectos que envolvem a área de terapia celular, considerando as abordagens científicas, de natureza ética e legal, e aprofundando-se sobre o estado da arte das terapias celulares, bem como as perspectivas futuras nesse campo, o financiamento público das pesquisas no Brasil, além de tocar no tema da propriedade intelectual. Em relação a este último, foram realizadas exposições sobre o regime de patentes internacional e a flexibilidade do setor saúde, a legislação nacional sobre propriedade intelectual, o impacto da concessão de patentes para a saúde e o desenvolvimento de produtos constituídos por ou à base de células e tecidos humanos com o foco na obtenção de patentes. Por fim, o último painel do Seminário objetivou o debate sobre os aspectos bioéticos e jurídicos, tendo sido proferidas palestras sobre a bioética em face do desenvolvimento das terapias celulares, a interpretação do artigo 199 da Constituição Federal sob a ótica destes produtos e a garantia de acesso da população brasileira às terapias celulares. Neste painel, foram abordadas reflexões que vislumbraram a reinterpretção da Constituição com o passar do tempo, considerando a evolução técnico-científica e a premência de assegurar o cumprimento dos direitos constitucionais básicos à população brasileira. Estas discussões foram vitais para impulsionar os processos de reinterpretção da vedação à comercialização de produtos de origem humana pela Constituição Federal e de elaboração da nova proposta de marco regulatório sanitário.

Em 2012, a Anvisa instituiu sua 1ª Câmara Técnica em Terapias Celulares (CAT), nos moldes da CAT Europeia¹³, sendo renomeada em 2016. A CAT conta atualmente, em sua estrutura, com consultores de notório conhecimento técnico em terapias celular e gênica e possui as seguintes atribuições: auxiliar na elaboração de regulamentos que definam os critérios técnico-sanitários para avaliação de ensaios clínicos e registro, emitir recomendações sobre a anuência de ensaios clínicos, sobre a segurança e a eficácia dos PTA e sobre o enquadramento sanitário destes produtos para fins de subsidiar decisões da área técnica e da Diretoria Colegiada da Anvisa (Dicol).

Agregando-se à contextualização apresentada, em 2013, o GT sobre terapia celular e gênica, integrado por representantes das principais agências sanitárias internacionais, em inglês,



International Pharmaceutical Regulators Forum (IPRF), publicou um resumo¹⁴ sobre as perspectivas regulatórias para as categorias de PTA, que concluiu:

- células que foram submetidas a manipulação substancial em laboratório ou que desempenham no receptor função distinta da desempenhada no doador representam um risco intrínseco elevado à saúde de quem as utilizar, logo, as pesquisas clínicas relacionadas, bem como sua utilização terapêutica, requerem avaliação e aprovação prévia pelas agências reguladoras;
- a origem das células - se autóloga (provenientes do próprio indivíduo) ou alogênica (obtidas de um doador) - representa menor impacto na avaliação de risco do que o grau de manipulação a que as células são submetidas;
- figura notável diferença entre o marco regulatório das células submetidas à manipulação mínima para uso em mesma função e o marco regulatório de células submetidas à manipulação mínima, mas que apresentam função distinta no receptor da desempenhada no doador; sendo que esta última situação denota avaliação de eficácia da terapia;
- algumas autoridades regulatórias exigem os produtos de origem autóloga de submissão às regras sanitárias aplicadas aos demais PTA, desde que processados à “beira do leito” em contexto hospitalar.

Enfim, em 2016, em virtude das discussões emanadas sobre o acesso da população brasileira aos PTA, e considerando o contexto regulatório nacional que se delineou em face da conformidade jurídica então fundamentada, a Procuradoria Federal junto à Anvisa, por meio de parecer jurídico¹⁵, concluiu pela possibilidade de registro e comercialização de PTA pautando-se no princípio da dignidade da pessoa humana e nos direitos fundamentais à vida e à saúde, condicionada à construção de um arcabouço normativo infraconstitucional rigoroso para garantir que as substâncias humanas a serem empregadas na fabricação dos PTA sejam captadas gratuitamente, por doação livre, espontânea e informada, de modo a afastar o risco de qualquer abuso. Essa releitura do teor constitucional abriu caminho para o desenvolvimento da proposta de marco regulatório a ser elaborado pela Agência. A Figura evidencia os primórdios do marco regulatório nacional afeto à área, culminando na decisão sobre a possibilidade de registro e comercialização dos PTAs.

MÉTODO

Foi realizada busca ampla aos normativos publicados, em nível nacional e internacional, afetos às temáticas “terapia celular”, “produtos de terapias avançadas” e “células-tronco”, sem delimitação temporal.

Foram avaliados os documentos oficiais publicados pelas Agências Reguladoras *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, e *European Medicines Agency* (EMA) da Comunidade Europeia, bem como pela Agência Japonesa de Produtos e Medicamentos (PMDA), disponíveis em seus sítios eletrônicos em

campos dedicados aos produtos de terapias avançadas. Contribuíram para o enriquecimento do presente artigo as contribuições de cunho pessoal dos autores, obtidas através da participação dos mesmos em fóruns específicos sobre a temática, de caráter regulatório e científico, no período entre os anos de 2005 e 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os riscos sanitários envolvidos na produção e uso de um PTA, a Anvisa optou por se pautar, em sua melhor concepção, na regulamentação estabelecida pela Europa como eixo conceitual norteador da proposta de marco regulatório nacional. Entretanto, a Agência se deparou com a necessidade de adaptar o conceito de PTA admitido pela EMA, de forma a melhor se ajustar à sua estrutura interna. Com esta perspectiva, a Anvisa passou a adotar as seguintes definições: PTA são produtos constituídos por células de origem humana ou seus derivados não quimicamente definidos, sendo categorizados em três tipos: os produtos de terapia celular avançada, os produtos de engenharia tecidual

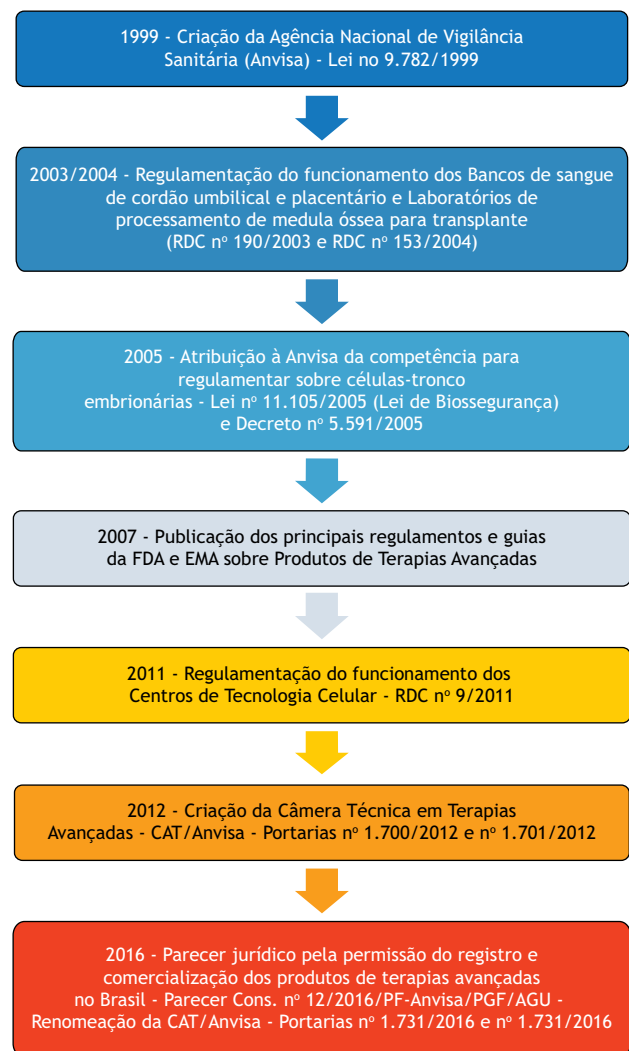


Figura. Linha do tempo: primórdios do marco regulatório sanitário relacionado aos Produtos de Terapias Avançadas, no Brasil.



e os produtos de terapia gênica. Esta última categoria abarca, de acordo com a definição sugerida pela Anvisa, somente os produtos de terapia gênica *ex vivo*. A categoria de produtos de terapia gênica *in vivo* - nos quais o produto final corresponde a sequência de ácidos nucleicos a ser infundida diretamente no paciente, com o objetivo de obter propriedade terapêutica, preventiva ou de diagnóstico, sem o intermédio de células carreadoras transfectadas *ex vivo* - foi então considerada tipo de produto biológico clássico, devendo seguir o arcabouço regulatório específico para tal classe de medicamento. De acordo com a definição adotada pela regulamentação nacional vigente, o produto que contém moléculas quimicamente definidas e possui atividade biológica conhecida enquadra-se hoje como medicamento biológico¹⁶.

Recapitulando, atualmente, os PTA em desenvolvimento no Brasil devem seguir o mesmo rito aplicado às terapias convencionais, sendo os ensaios clínicos analisados apenas pelo Sistema CEP/Conep responsável por, dentre as suas atribuições, avaliar e aprovar as pesquisas envolvendo seres humanos, de forma a atender aos fundamentos éticos e científicos pertinentes¹⁷; e o uso terapêutico dos produtos sendo reconhecido pelo CFM ou CFO.

Entretanto, o passar a reconhecer os PTA sob a égide de *produtos terapêuticos* implica que a Anvisa assumirá a responsabilidade pela avaliação de sua qualidade, segurança e eficácia, conforme determinam as Leis nº. 6.360, de 23 de setembro de 1976¹⁸, e nº 9.782/1999¹. A Anvisa, diante desta premissa, deverá passar a emitir o registro sanitário dos referidos produtos previamente à sua comercialização ou disponibilização à população.

Diante deste contexto, para a compreensão do marco regulatório nacional para PTA a ser elaborado, o Quadro resume a respectiva proposta, conforme consta da Agenda Regulatória da Anvisa - Quadriênio 2017-2020¹⁹.

Boas Práticas em Células humanas para fins terapêuticos e de pesquisa clínica

A RDC que disporá sobre as Boas Práticas em Células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica compõe a proposta de marco regulatório para PTA no Brasil, conjuntamente às

normativas que regulamentarão a pesquisa clínica, o registro e a Certificação de Boas Práticas de estabelecimentos produtores.

A minuta de RDC de Boas Práticas em Células encontra-se alinhada com o arcabouço regulatório internacional em *Good Manufacturing Practices* (GMP)²⁰ e contempla a base conceitual e as condições de manipulação necessárias para os PTA, de acordo com a sua categorização de risco, ao determinar que:

- todas as atividades desenvolvidas no centro de processamento celular sejam claramente definidas e sistematicamente revisadas;
- sejam fornecidos todos os recursos necessários à realização das atividades desenvolvidas, incluindo pessoal qualificado e capacitado; infraestrutura física; equipamentos, instrumentos, sistemas informatizados, fornecedores, serviços de apoio e, se for o caso, serviços terceirizados; materiais, reagentes e produtos para diagnóstico *in vitro*; e protocolos aprovados e vigentes;
- sejam realizadas as validações, qualificações e calibrações necessárias;
- seja mantida a rastreabilidade dos produtos e os registros demonstrem que todas as etapas do processo produtivo foram seguidas e que a quantidade e a qualidade do produto obtido estão em conformidade com o esperado;
- os registros que possibilitam a rastreabilidade dos PTA sejam arquivados de maneira segura, organizada e de fácil acesso;
- esteja implementado sistema capaz de recolher qualquer produto não conforme; e
- sejam tomadas e registradas medidas cabíveis com relação aos PTA não conformes e, quando couber, adotadas as providências para a prevenção de recorrências.

Ensaio clínico com produtos de terapias avançadas

O modelo regulatório norteador da presente proposta de RDC tomou por base a RDC nº 9, de 20 de fevereiro de 2015²¹, que dispõe sobre o regulamento para a realização de ensaios clínicos

Quadro. Proposta de marco regulatório sanitário para os Produtos de Terapias Avançadas, no Brasil.

Regulamentação - Anvisa (Dispõe sobre)	Objetivo
Boas Práticas em Células humanas para fins terapêuticos e de pesquisa clínica	Padronizar as Boas Práticas em Células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica, por meio do estabelecimento de requisitos técnico-sanitários mínimos relacionados ao ciclo produtivo de células e produtos de terapias avançadas, visando à segurança e à qualidade destes produtos.
Ensaio clínico com produtos de terapias avançadas	Definir os procedimentos e requisitos regulatórios para a realização de ensaios clínicos com produtos de terapias avançadas investigacionais no Brasil, incluindo o Dossiê de Desenvolvimento Clínico do Produto a ser submetido à Anvisa para fins de anuência.
Registro de produtos de terapias avançadas	Estabelecer os requisitos mínimos para o registro de Produtos de Terapias Avançadas, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia.
Certificação de Boas Práticas para os estabelecimentos produtores	Definir os procedimentos administrativos para a concessão da Certificação de Boas Práticas em Células, a qual assegurará que o Centro de Processamento Celular cumpre os requisitos de Boas Práticas em Células, conforme regulamento específico.



com medicamentos no Brasil. Ambos os modelos se encontram alinhados com o documento das Américas de Boas Práticas Clínicas²² - conjunto de normas e orientações éticas e científicas direcionadas para o desenho, condução, registros e divulgação de resultados de estudos clínicos, embora a proposta de regulamentação dos ensaios clínicos com PTA deverá ter em conta as especificidades destes produtos, visto que o produto final considerado é, em síntese, constituído por células viáveis, e não por moléculas quimicamente definidas.

Com relação aos ensaios clínicos, os principais objetivos da proposta regulatória são:

- a) garantir a segurança e os direitos dos participantes dos ensaios clínicos;
- b) assegurar que tais ensaios sejam adequadamente conduzidos por investigadores qualificados;
- c) solicitar a revisão e a aprovação do protocolo de ensaio clínico por comissões científicas;
- d) exigir modificações do protocolo e/ou interrupção dos ensaios, quando necessário; e
- e) permitir inspeções *in loco* para confirmar a qualidade e confiabilidade dos dados obtidos²¹.

Em conformidade à tal proposta, o patrocinador do ensaio ou o investigador-patrocinador, na condição de responsável pela coordenação e condução do protocolo de ensaio clínico, deverá organizar em formato de dossiê o plano de desenvolvimento do produto e compilar os dados sobre os aspectos de qualidade do PTA investigacional, de forma a agregar informações para mitigar possíveis riscos aos participantes dos ensaios clínicos. Assim, a proposta de regulamentação dos ensaios clínicos a serem desenvolvidos com PTA investigacional deverá pautar-se em aspectos relacionados à qualidade do produto, bem como em informações sobre segurança, de forma a complementar a avaliação de preceitos bioéticos, realizada pelo sistema CEP/Conep.

Registro de Produtos de Terapias Avançadas

O regulamento que tratará do registro de PTA terá como objetivo principal o estabelecimento de critérios jurídico-administrativos e técnico-científicos concernentes à produção, introdução no mercado, comercialização e uso terapêutico dos PTA.

A proposta de registro de PTA, assim como a regulamentação dos ensaios clínicos destes produtos deverá ter em conta as suas especificidades. Deverão ser levadas em consideração, por exemplo, as questões sobre:

- a) a seleção do doador (triagens clínica, física, social e laboratorial);
- b) o tipo e a origem do produto, se autólogo ou alogênico;
- c) a raridade da doença a ser tratada, ou seja, escassez de número de pacientes disponíveis para a realização dos ensaios clínicos;

- d) as dificuldades em conduzir estudos controlados;
- e) a complexidade de monitorar parâmetros de qualidade relacionados ao produto final disponibilizado para uso; e
- f) a garantia da homogeneidade de lotes de células.

Frente às peculiaridades dos PTA, a proposta de registro tem considerado, em especial, o gerenciamento de risco bem como a implantação de mecanismos que permitam à Agência conceder um tipo de registro sanitário provisório a estes produtos, tal como o modelo adotado pela PMDA²³. Estas são as principais inovações desta proposta regulatória, a qual busca simplificar o rito regulatório sem abrir mão de segurança e qualidade.

A assertiva que vem sendo avaliada pela Anvisa e CAT, no que tange ao registro de PTA, dessarte, se resume na seguinte linha de atuação:

- Emissão de registro para os PTA submetidos a técnicas de manipulação extensa - enquadramento do produto em classe de maior risco: será solicitado o envio à Anvisa de estudos completos para a concessão do registro, por meio de dossiê com informações sobre a qualidade (dados do material de partida e das matérias-primas utilizadas durante a produção do produto, validações e controles de qualidade, estabilidade, manutenção de rastreabilidade, entre outros), além dos relatórios dos estudos não clínicos e clínicos desenvolvidos com o produto, de forma a comprovar sua segurança e eficácia.
- Emissão de registro simplificado, exclusivo para PTA submetidos a técnicas de manipulação mínima e que desempenham no receptor função distinta da função de origem desempenhada no doador. Neste caso, assume-se que as técnicas de manipulação mínima não alteram de forma significativa as características biológicas das células: o dossiê a ser analisado pela Anvisa deverá conter apenas os relatórios dos estudos não clínicos e clínicos desenvolvidos com o produto, de forma a comprovar sua segurança e eficácia.
- Emissão de autorização ou registro provisório - categoria de análise tal como sancionada pela PMDA - na qual uma autorização provisória é concedida, desde que os ensaios clínicos realizados comprovem segurança e indícios de eficácia. Neste caso, os pacientes que fizerem uso terapêutico dos produtos certificados através deste tipo de autorização deverão ser certificados de tal informação, por meio da assinatura de Termo de Consentimento específico, e os centros clínicos possuirão a responsabilidade de desenvolver mecanismos rigorosos de monitoramento e acompanhamento pós-mercado²¹. No Japão, esta autorização provisória é válida por prazo determinado e, após vencimento de tal prazo, as empresas fabricantes devem submeter a documentação completa para a concessão do registro definitivo do PTA pela Agência reguladora. Esta proposta tem sido admitida, do ponto de vista regulatório, com boas perspectivas, dado que possibilitará o alcance das especificidades dos PTA, abordadas anteriormente no presente artigo.



Certificação de Boas Práticas para os estabelecimentos produtores

De forma a totalizar a proposta de marco regulatório para PTA, a Anvisa vislumbra a emissão de um Certificado de Boas Práticas para estabelecimentos produtores, de forma a declarar que cumprem os requisitos de Boas Práticas. O processo administrativo para fins da emissão de tal Certificação ainda carece de discussão aprofundada, embora possivelmente assumirá as condições estabelecidas nos moldes da certificação que já é concedida para os estabelecimentos produtores de medicamentos e de produtos para a saúde registrados no Brasil²⁴, e mediante inspeção *in loco* pela Anvisa.

CONCLUSÕES

A ausência de um marco regulatório nacional para os PTA denota ao setor produtivo instabilidade, de forma a repercutir negativamente no interesse pelo desenvolvimento de pesquisas em campo nacional e dificultar o acompanhamento do desenvolvimento tecnológico mundial observado para a área. A proposta de instituição do marco regulatório nacional para os PTA se faz necessária para dirimir a lacuna regulatória atualmente existente e possibilitar a ação fundamentada e coordenada do agente regulador. Nesta conjuntura, a atuação da Câmara Técnica de Terapias Avançadas

(CAT/Anvisa) tem se mostrado fundamental na elaboração, em conjunto com a equipe da Anvisa, do respectivo marco regulatório nacional para os PTA, em consonância com o que vem sendo desenvolvido pelas principais agências reguladoras internacionais.

A proposta de marco regulatório apresentada neste artigo tem como objetivo assegurar o cumprimento da missão institucional da Anvisa - proteger e promover a saúde da população, mediante a intervenção nos riscos decorrentes da produção e do uso de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária. Neste sentido, a perspectiva da Agência é que, no próximo triênio, o marco regulatório nacional para PTA seja publicado, na forma de regulamentos que definirão as Boas Práticas em Células humanas para uso terapêutico, os critérios para a realização de ensaios clínicos, bem como a anuência de registro e pós-registro destes produtos, além do regulamento para a Certificação de Boas Práticas dos centros de processamento celular. Este marco regulatório terá o objetivo de assegurar a qualidade, a segurança e a eficácia destes novos produtos e, desta forma, garantir acesso seguro aos futuros usuários. A partir da convergência regulatória, pretende-se harmonizar diretrizes nacionais e internacionais e criar um ambiente regulatório estável e transparente, de forma a propiciar o desenvolvimento tecnológico em âmbito nacional e atrair investimentos para o setor.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Lei Nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial União. 27 jan 1999.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 190, de 18 de julho de 2003. Determina Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário. Diário Oficial União. 21 jul 2003.
3. 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.
4. 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 2005.
5. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Stem cell information: Regenerative medicine. Bethesda: National Department of Health and Human Services; 2006[acesso 20 out 2017]. Disponível em: https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine.htm
6. European Union. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) Nº 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) Nº 726/2004. Official J European Union. 10 dec 2007.
7. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Considerations for the design of early-phase clinical trials of cellular and gene therapy products: guidance for industry. Silver Spring: Food and Drug Administration; 2015[acesso 23 out 2017]. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM564952.pdf>
8. European Union. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. [acesso 23 out 2017]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf
9. BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal;1988.
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. RDC Nº 9, de 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. Diário Oficial União. 18 mar 2011.



11. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme - PIC/S. Geneva; 2017[acesso 23 out 2017]. Disponível em: <https://www.picscheme.org/>
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Relatório Seminário Nacional sobre Regulação em Terapias Celulares. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2012.
13. European Medicines Agency. Committee for Advanced Therapies - CAT. London: European Medicines Agency; 2017[acesso 23 out 2017]. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000266.jsp
14. International Pharmaceuticals Regulators Forum - IPRF. International Regulatory perspectives: degree of regulatory oversight for eight categories of cell therapy products. [S.l.]: International Pharmaceuticals Regulators Forum; 2013[acesso 23 out 2017]. Disponível em: https://www.i-p-r-f.org/files/4714/5387/8143/IPRF_Cell_Therapy_WG_Meeting_Report_2013.pdf
15. Brasil. Advocacia-Geral da União. Procuradoria-Geral Federal. Procuradoria Federal junto à Anvisa. Parecer Cons. n° 12/2016/PF-ANVISA/PGF/AGU. Consulta preliminar ao prosseguimento da proposta. Viabilidade jurídica de registro e comercialização de produtos de terapias avançadas. Releitura do §4° do art. 199 da Constituição Brasileira. 31 mar. 2016.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. RDC N° 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Diário Oficial União. 17 dez 2010.
17. Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS N° 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Diário Oficial União. 13 jun 2013.
18. Brasil. Lei N° 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial União. 24 set 1976.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Agenda Regulatória Quadriênio 2017-2020. Diário Oficial União. 6 dez 2017.
20. European Union. Good manufacturing practice for advanced therapy medicinal products: consultation document. Brussels; 2017[acesso 23 out 2017]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/advtherapies/2016_06_pc/2016_06_draft_guideline.pdf
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. RDC N° 9, de 20 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre o Regulamento para a realização de ensaios clínicos com medicamentos no Brasil. Diário Oficial União. 21 fev 2015.
22. Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS. Boas práticas clínicas: documento das Américas. IV Conferência Pan-Americana para Harmonização da Regulamentação Farmacêutica; 2-4 mar 2005[acesso 23 out 2017]; República Dominicana. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/boas-praticas-clinicas-documento-das-americas>
23. Sato, D. Regulatory trends in regenerative medicines in Japan. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; 2015[acesso 23 out 2017]. Disponível em: <https://www.pmda.go.jp/files/000206920.pdf>
24. Brasil. Decreto N° 8.077, de 14 de agosto de 2013. Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos que trata a Lei n° 6360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. Diário Oficial União. 15 ago 2013.

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.

Produtos de Terapias Avançadas: uma introdução ao gerenciamento de riscos

Advanced Therapy Medicinal Products: an introduction to risk management

João Batista Silva Junior*

Marília Rodrigues Mendes Takao

Renata Miranda Parca

RESUMO

Introdução: Produtos de terapias avançadas compreendem três categorias: produtos de terapia celular avançada, de engenharia tecidual e de terapia gênica, que prometem benefícios importantes para a saúde. Estes produtos contêm células viáveis submetidas a manipulação extensa ou construções genéticas, as quais possuem a finalidade de obter propriedades terapêuticas ou preventivas através de mecanismo de ação de natureza metabólica, imunológica ou farmacológica. **Objetivo:** Discutir os principais riscos envolvidos na produção e fornecimento dos produtos de terapias avançadas na perspectiva de desenvolver práticas regulatórias de gerenciamento de risco. **Método:** Revisão da literatura científica e documentos oficiais das agências reguladoras dos Estados Unidos e Europa. **Resultados:** Compreender como os possíveis mecanismos de ação dos produtos de terapias avançadas contribuem para mitigar riscos de desenvolvimento e caracterização, inclusive através do aperfeiçoamento de modelos clínicos ou outros ensaios funcionais. Raridade da doença, grau de benefício previsto e perfil de segurança afetarão o número de participantes e outros aspectos de design de ensaios clínicos. Este tipo de produto apresenta alto grau de complexidade técnica e desafios substanciais para sua produção. **Conclusões:** As principais agências reguladoras demonstram esforços para estabelecer regras claras de preparação dos produtos de terapias avançadas, segundo as Boas Práticas de Fabricação e a realização de ensaios clínicos de forma a racionalizar requisitos adaptados às características específicas dos referidos produtos.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia Celular; Boas Práticas de Fabricação; Ensaios Clínicos; Riscos; Vigilância Sanitária

ABSTRACT

Introduction: Advanced therapy products include gene therapy, somatic cell therapy, and tissue engineering products that promise important health benefits. These products contain active cells or genetic constructs that exert a mechanism of metabolic, immunological, genetic or pharmacological action. **Objective:** To discuss main risks involved in advanced therapy products to understand risk management regulatory models and practices. **Method:** Review in the scientific literature and in official documents of the regulatory agencies of the United States and Europe. **Results:** Advanced therapy products can be difficult to define, particularly cell-based products. Completely elucidating the mechanisms of action contributes to mitigate risk of development and characterization, including through the development of disease models or other functional assays. Disease severity, predicted benefit level and safety profile will affect the number of participants and other design aspects of each test. They present a high degree of technical complexity and substantial challenges to their manufacture. **Conclusions:** Major regulatory agencies demonstrate efforts to establish clear rules for the preparation of advanced cellular products compatible with Good Manufacturing Practices and the conduct of clinical trials in order to rationalize requirements adapted to the specific characteristics of advanced therapy products.

¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Brasília, DF, Brasil

* E-mail: batista.junior@anvisa.gov.br

Recebido: 21 out 2017

Aprovado: 25 jan 2018

KEYWORDS: Cell Therapy; Good Manufacturing Practices; Clinical Trials; Risks; Health Surveillance



INTRODUÇÃO

O uso de partes do corpo humano como produtos terapêuticos é uma prática clínica antiga e fortemente regulada. O termo “transplante” é empregado para designar todo ato cirúrgico para obtenção de células e retirada de órgãos, tecidos ou partes de corpo vivo ou morto para infusão ou implante em um receptor. Como bem esclarece Catão (p. 202)¹, [...] “em geral os transplantes estão submetidos a uma classificação no âmbito cirúrgico voltada, principalmente, a resguardar a compatibilidade biológica entre doador e receptor”. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)^{2,3}, células e tecidos humanos para transplantes representam uma classe terapêutica essencial à saúde humana capaz de restaurar e manter as funções vitais do receptor/paciente. Além disso, células e tecidos humanos tornam-se um importante material de partida para produtos biotecnológicos mais complexos.

Segundo relatório do Ministério da Saúde⁴, no ano de 2016, no Brasil, foram realizados 16.636 procedimentos de transplantes de córnea e 2.362 transplantes de medula óssea. O mesmo relatório descreve o Brasil como o segundo maior país transplantador de órgãos sólidos, como rins (5.492 transplantes no ano de 2016) e fígado (1.880, 2016), abaixo somente dos Estados Unidos. O relatório da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO)⁵ mostrou que, em 2016, foram realizados 16.293 enxertos ósseos humanos nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul. Agregados estes dados aos da estimativa de transfusões de sangue no Brasil, aproximadamente 3 milhões de procedimentos realizados em 2015⁶, tem-se a dimensão da importância dos produtos de sangue, tecidos, células e órgãos humanos para a saúde pública do país, bem como percebem-se os desafios dos órgãos reguladores para garantir a qualidade e a segurança destes produtos.

O progresso científico e os avanços no setor biotecnológico conduziram a uma nova perspectiva, conhecida como a era da medicina regenerativa, que emprega produtos com o objetivo de substituir ou regenerar células humanas, tecidos ou órgãos para fins de restaurar ou estabelecer a função normal do indivíduo⁷. Segundo Mason e Dunnill⁷, por definição, a medicina regenerativa é uma oportunidade para todas as principais especialidades clínicas de uso de produtos incluindo dispositivos médicos, pequenas e complexas moléculas biológicas (medicamentos), bem como produtos terapêuticos constituídos por ou à base de células humanas⁸, com ou sem seu material genético recombinado, bem como organizadas em tecidos humanos *in vitro*.

Neste contexto, uma nova classe de produtos celulares ou originados de células humanas vem sendo considerada, em âmbito mundial, como novo arsenal terapêutico para diversas condições patológicas ou clínicas antes sem alternativas⁹. Internacionalmente, estes produtos são denominados produtos de terapias avançadas ou, em inglês, *Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMP), e abarcam três categorias: os produtos de terapia celular avançada, os produtos de terapia gênica e os produtos de engenharia tecidual, podendo ser combinados com dispositivos médicos¹⁰.

Após 8 anos de vigência das normas regulatórias aplicadas aos produtos de terapias avançadas na Europa, segundo Eve et al. (apud Hanna et al.¹¹), apenas cinco produtos receberam registro sanitário

na Agência Europeia, até outubro de 2015: *ChondroCelect* para reparo de cartilagens (2009); *MACI* para reparo de cartilagens (2013), com encerramento da sua fabricação em 2014; *Glybera* para tratamento de deficiência da lipoproteína lipase - LPL (2013); *Provenge* para tratamento de câncer de próstata avançado (2013), retirado do mercado europeu em 2015; *Holoclar* para tratamento da deficiência de células epiteliais da córnea (2015). As autoridades reguladoras dos Estados Unidos, Japão e Coreia do Sul desenvolveram mecanismos de aprovações condicionais ou provisórias para produtos de terapias avançadas, em circunstâncias específicas. Coreia do Sul foi o primeiro país a oferecer aprovações condicionais em 2001, embora não especificamente para produtos avançados. A *Korea Food and Drug Administration* (KFDA) autorizou 18 produtos de terapias avançadas desde 2001, a maioria com caráter provisório. A Agência Reguladora do Japão, *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* (PMDA), também adotou a aprovação condicional em sua legislação, de forma a autorizar os produtos de terapias avançadas mediante a comprovação de sua segurança e provável eficácia (dados de eficácia de estudos de Fase II), portanto, os respectivos produtos ainda deveriam ser submetidos aos estudos de Fase III para confirmação de sua eficácia.

Levando em consideração o delineamento do cenário mundial em face do desenvolvimento dos produtos de terapias avançadas, o presente estudo tem como objetivo discutir os principais riscos à saúde envolvidos na produção e fornecimento para uso terapêutico dos produtos de terapias avançadas, na perspectiva de compreender modelos e práticas regulatórias adotadas pelas principais agências reguladoras no processo de gerenciamento destes riscos.

MÉTODO

Foi realizada revisão bibliográfica nas bases de dados *online* Lilacs, SciELO e PubMed, por meio de busca pelos termos em inglês “*advanced cell therapy*” e “*Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMP)” e do termo em português “*terapia celular*”, em artigos publicados no período entre os anos de 2000 a 2017. A seleção inicial considerou os títulos e os resumos dos artigos originais de interesse ao trabalho, indexados no período de estudo. Os artigos científicos que abordaram algum tipo de estudo regulatório ou de análise de riscos relacionados aos produtos de terapia avançada foram analisados em sua íntegra e incluídos no processo de trabalho. A grande maioria dos artigos encontrados delinearão estudos clínicos ou experimentais e, desta forma foram excluídos. Também foram avaliados documentos oficiais da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e da *European Medicines Agency* (EMA) da Comunidade Europeia, disponíveis em seus sítios eletrônicos dedicados aos produtos de terapias avançadas.

Foram incluídos neste estudo 32 artigos científicos e 19 documentos oficiais, organizados em pastas eletrônicas de forma a conter a descrição das informações relacionadas aos conceitos e caracterização dos riscos envolvidos em alguma das etapas do processo de desenvolvimento e do uso dos produtos de terapias avançadas. A descrição mencionada foi disposta em planilha *Microsoft Excel* para facilitar análise dos dados obtidos.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

No âmbito regulatório, da análise do arcabouço normativo adotado pelos Estados Unidos, observou-se que os requisitos regulamentares definidos pela FDA para os produtos de terapias avançadas levam em consideração se a célula ou o tecido é “minimamente manipulado” ou “mais do que minimamente manipulado”. A manipulação mínima tipifica o processamento que não altera de forma significativa as características biológicas primárias das células ou tecidos, como, por exemplo, separação por gradiente de densidade, seleção, centrifugação e criopreservação. Todos os processos de manipulação de células ou tecidos com o potencial de alterar qualquer de suas características biológicas relevantes, dentre as quais se inclui estado de diferenciação e ativação, potencial de proliferação e atividade metabólica - como, por exemplo, o cultivo em laboratório com o objetivo de expansão, diferenciação ou alteração genética - são considerados manipulações mais do que mínimas, logo, exigem controles específicos¹². Além disso, outra condição que suporta a exigência de controles diferenciados é a combinação das células ou dos tecidos com outro componente ou dispositivo, exceto água, cristaloides ou agentes de esterilização, de preservação ou de armazenamento. O mecanismo de ação do produto também possui o caráter de despertar a atenção regulatória quando sugere ou confirma a execução de sua função primária quando sugere ou confirma a execução de sua função primária através de um efeito sistêmico e dependente da atividade metabólica das células viáveis; ou, ainda, se tiver intenção de uso reprodutivo¹³. Em suma, é possível apreender, a partir da análise das normativas americanas que, independentemente da abordagem classificada, os produtos de terapias avançadas devem ser manipulados consoante diretrizes de boas práticas empregadas aos produtos biológicos¹³, sendo aqueles submetidos à manipulação mais do que mínima acrescidos de regras regulatórias específicas.

Na mesma direção que os americanos, a União Europeia (UE) propôs um plano de ação que definiu os produtos de terapias avançadas como uma categoria de medicamento, passível de submissão aos mesmos critérios científicos e regulamentares definidos para todo medicamento e produto para a saúde, o que quer dizer que também devem ter pesquisas clínicas aprovadas e fornecimento para uso condicionado ao registro do produto junto ao órgão regulador¹⁰. Segundo Gálvez et al.¹⁴, sucessivos regulamentos foram efetivados na Europa, os quais definiram os produtos de terapias avançadas como medicamentos biológicos que contêm ou são constituídos por células viáveis ou por frações subcelulares com funções biológicas. Desta forma, conformou-se o entendimento que estes produtos não poderiam ser incluídos nas mesmas categorias dos medicamentos propriamente ditos nem na categoria dos produtos para transfusão, enxertos e transplantes convencionais, visto que: (A) contêm células humanas viáveis, de origem alogênica ou autóloga, submetidas a manipulação substancial e (B) podem apresentar uso não homólogo, o que significa que as células são administradas em locais do corpo onde elas geralmente não estão presentes, ou desempenham função biológica no receptor distinta da desempenhada no doador^{14,15}.

Segundo Schneider et al.¹⁵, a definição da tipologia dos produtos de terapias avançadas é fundamental para estabelecer os requisitos de mitigação de risco sanitário. Os autores, por meio da utilização do modelo europeu, classificaram os produtos em três grandes grupos: os que são constituídos por células vivas submetidas a processos de cultivo, expansão e otimização celular; os produtos de engenharia tecidual constituídos por células vivas organizadas em tecidos ou órgãos; e os produtos de terapia gênica *in vivo* “cujos efeitos terapêuticos são exercidos por meio da infusão no organismo humano de moléculas recombinantes de ácidos nucleicos e, portanto, são definidos como um produto ou medicamento biológico” e terapia gênica *ex vivo*, aqueles constituídos por ou à base de células modificadas geneticamente. Estas três categorias de produtos de terapias avançadas poderiam ser combinadas ou não com suportes sólidos ou, quando aplicável, a materiais de encapsulamento. Quaisquer matrizes, fibras, grânulos ou outros materiais que são utilizados para além das células podem ser categorizados como excipientes, componentes ativos adicionais ou dispositivos médicos.

Tanto a legislação americana quanto a europeia tratam os produtos terapêuticos oriundos de células e tecidos humanos para transfusão ou transplantes convencionais como materiais biológicos que conservam suas características originais aos serem infundidos/transplantados em um receptor. Isto posto, devido ao fato de manter as características e funções originais, o uso terapêutico convencional das células e tecidos prescinde de comprovação de segurança e eficácia por meio de ensaios clínicos aprovados pelo órgão regulador sanitário, bem como não segue o mesmo rito de aprovação de registro de um medicamento sintético ou biológico clássico. Neste caso, exigem-se os requisitos de Boas Práticas aplicadas à obtenção e ao processamento de células e tecidos, para fins de garantir a qualidade do material biológico^{10,12,13}. Esta mesma racionalidade é a adotada pelo modelo regulatório brasileiro para os produtos de sangue, outros tecidos, células e órgãos para fins de uso terapêutico convencional.

Os produtos de terapias avançadas, os quais, via de regra, são submetidos à manipulação substancial e/ou desempenham no receptor função distinta da desempenhada no doador, carecem de ter sua segurança e eficácia comprovadas por meio de ensaios clínicos avaliados e aprovados pelo órgão regulador sanitário e devem deter registro sanitário, para que possam ser fornecidos para uso terapêutico. Os requisitos de Boas Práticas aplicam-se, igualmente, aos produtos de terapias avançadas. Em relatório da *European Medicines Agency (EMA)*¹⁶ sobre a experiência na regulação de ATMP, foi recomendada a racionalização das práticas de certificação e de registro para comercialização dos produtos de terapias avançadas, mediante o emprego de ferramentas de promoção de contatos iniciais entre o agente regulador e o centro desenvolvedor do produto e seus pesquisadores, de forma a criar um ambiente regulatório favorável.



Riscos na produção x Boas Práticas de Fabricação

A OMS definiu Boas Práticas de Fabricação (BPF) como “parte da garantia de qualidade que assegura que os produtos sejam consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade adequados aos usos pretendidos”¹⁷. As BPF abrangem todos os aspectos da produção, incluindo validação de etapas críticas, instalações adequadas, armazenamento, transporte, pessoal qualificado, adoção de procedimentos escritos e aprovados, registros documentais, mecanismos de rastreabilidade, sistemas de recolhimento de produtos após a distribuição, investigação de não conformidades e reclamações, dentre outros aspectos. Para quaisquer produtos de uso humano é essencial a aplicação de elevados padrões de qualidade, gestão em produção e sistema de gerenciamento de riscos^{18,19}.

Para os produtos de terapias avançadas, devido à sua complexidade e aos riscos potenciais envolvidos na sua obtenção e produção, os artigos analisados discutem a necessidade de comprovação de que a manipulação extensa não interfere na viabilidade celular e não gera sítios de instabilidade cromossômica. Bem como apontam a importância de assegurar que tal produto age no sítio alvo farmacológico, de forma segura e eficaz¹⁹. Alguns dos desafios residem na variabilidade e complexidade inerentes aos componentes utilizados para gerar o produto final, tais como a fonte variável de células, o potencial de contaminação por agentes infecciosos provenientes do doador e da manipulação, o processo de produção e a expansão celular com o uso de soluções, meios e suplementos, eventual processamento em ambientes não isolados, a incapacidade em esterilizar o produto final, dentre outros. Segundo D’Ippolito et al.²⁰, fatores como densidade celular, tempo de cultura, número de passagens, flutuações de temperatura, alterações de tensão de pH e oxigênio devem fazer parte dos elementos de controle. Além disso, o processo de cultivo em sistemas abertos, mesmo que conduzido sob requisitos rigorosos de BPF, pode ser afetado pela alteração frequente dos parâmetros ambientais, como temperatura, PCO₂, PO₂, pH e umidade.

Segundo Herberts et al.²¹, os pacientes tratados com esses produtos celulares enfrentam riscos de exposição a príons, quando da utilização de suplementos de origem animal, riscos toxicológicos devido à presença de agentes tóxicos como endotoxinas e riscos imunológicos devido à presença de proteínas, peptídeos ou outras biomoléculas alo gênicas ou devido à contaminação de agentes de origem animal que poderiam persistir após a produção. A distribuição também pode ser um grande desafio devido à instabilidade dos produtos celulares.

Os produtos de terapia avançadas constituem, frequentemente, soluções complexas contendo células ou seus derivados que não podem ser quimicamente definidas, condição esta que os diferencia de um medicamento biológico clássico. A realização de controle de qualidade do processo de produção, bem como do produto final obtido é considerada essencial. Controles de processos de produção inadequados podem resultar na introdução de agentes contaminantes, em alterações desconhecidas nas propriedades biológicas ou em instabilidade do produto que pode ser indetectável nos ensaios de aprovação do produto final. Outro

fator de controle é a reprodutibilidade lote a lote, tanto do produto final quanto dos materiais críticos envolvidos na produção²².

A complexidade científica relacionada aos produtos de terapias avançadas pode impor limites práticos aos processos de controle. Conceitos como “lote”, “dose” e “concentração” se mostraram diversificados e peculiares, tendo sido destacada a incapacidade de controlar fatores como a variabilidade sujeito a sujeito (doadores). Ainda, os documentos analisados ressaltaram que alguns produtos podem levar várias semanas a meses para serem produzidos e que questões como viabilidade celular e potência biológica podem diminuir ou se alterar rapidamente a partir da formulação. Portanto, as células “frescas”, que não são criopreservadas, podem exigir administração dentro de poucas horas após sua produção. Os vários autores demonstraram também riscos no processo de criopreservação e armazenamento^{23,24,25}.

Diante dos riscos denotados, os diversos autores afirmaram que o estabelecimento de Boas Práticas se destina a manter estes riscos em um nível de controle aceitável, segundo padrões previamente estabelecidos pelo centro de processamento celular, minimizando a ocorrência de contaminação exógena do produto e deterministicamente assegurando a qualidade e a segurança do produto em termos de riscos infecciosos, imunológicos e toxicológicos²¹. Paralelamente a testes microbiológicos, endotoxina e testes de pirogênio, o controle de qualidade deveria incluir uma avaliação de dose, viabilidade e funcionalidade celular, a qual estaria diretamente vinculada ao prognóstico pós uso dos produtos. Keating²⁶ inferiu que os fenótipos também deveriam ser investigados apesar do autor descrever a falta de ensaios padronizados para determinados tipos celulares. Além dos métodos de caracterização celular outras ferramentas moleculares avançadas, incluindo avaliações do transcriptoma celular, proteoma e secretoma deveriam ser compreendidos^{26,27}. Foi sugerida a avaliação da estabilidade genética do produto celular, de acordo com Barkholt et al.²⁸, mesmo que ainda não haja correlação definitiva com a tumorigenicidade. Tanto Barkholt et al.²⁸ como Wang et al.²⁹ referiram a cariotipagem convencional como um teste de baixa sensibilidade por não prever a estabilidade completa do genoma e sugeriram a adoção de testes de alta performance como a hibridização genômica comparativa. Ao identificar as medidas de controle mais apropriadas em cada caso, o produtor deveria considerar todos os riscos potenciais relacionados ao produto, ao processo de fabricação e ao uso, com base nas informações disponíveis.

Por estas razões, os documentos analisados apontaram a importância de os centros de processamento celular, fornecedores dos produtos de terapias avançadas, implantarem a gestão de qualidade de seus processos assim como serem sujeitos avaliação de seu processo produtivo pela autoridade competente condicionado à fiscalização, como forma de garantir o cumprimento das normativas vigentes.

Riscos de eficácia e segurança x ensaios clínicos

Os documentos argumentaram que, em contraste com algumas classes de medicamentos bem estudadas, por exemplo, os produtos biológicos constituídos por moléculas quimicamente



definidas, há uma carência relativa de experiência clínica com produtos de terapias avançadas. Estes produtos têm complexidade única devido à natureza dinâmica das células. Por exemplo, as células podem apresentar uma variedade de moléculas nas suas membranas e expressar diversos fatores^{19,30}.

O desenvolvimento de um medicamento deve respeitar, tipicamente, as três fases tradicionais de ensaios clínicos, iniciando-se com ensaios em pequena escala e testando-se uma série de doses em voluntários sadios para estabelecer a dose mais tolerável (fase I), os estudos de eficácia precoce para testes de dose-resposta e otimização (fase II) e, finalmente, os ensaios clínicos com um número maior de participantes, concebidos para confirmar e caracterizar completamente a eficácia do produto (fase III). Os ensaios de fase III fornecem base para análise de custo-efetividade e posterior registro sanitário. Os produtos de terapias avançadas não se encaixariam precisamente neste quadro. Devido, por exemplo, à possibilidade da persistência desses produtos no organismo após sua aplicação e de possível toxicidade relacionada, o risco de utilizar indivíduos saudáveis na fase I torna-se injustificável³⁰. Os ensaios clínicos em fase inicial são, portanto, geralmente realizados em pacientes resultando em estudos classificados como de fase I/II. A diversidade das terapias avançadas exige abordagem diversa, o que implica em envolvimento entre pesquisadores, produtores e reguladores para aprovação da lógica de desenvolvimento e validação do projeto de ensaio clínico¹⁹.

A disponibilização sistêmica dos produtos e a variedade de tecidos no corpo poderiam propiciar a migração celular para locais não intencionais. Muito discutido, inclusive, o aspecto de as células possuírem a capacidade de se diferenciar *in vivo* em tipos ou linhagens de células diferentes das originais infundidas, podendo vir a desenvolver funções autônomas indesejáveis e afetar moléculas e outros fatores de acordo com o novo microambiente de inserção. O apelo clínico da maioria dos produtos de terapias avançadas baseia-se, portanto, no seu elevado potencial proliferativo e diferenciador, especialmente na capacidade de secretar citocinas, fatores de crescimento e outras substâncias fármaco e imunologicamente ativas^{31,32}. No entanto, essas potencialidades também poderiam expor pacientes a risco oncogênico, bem como ao risco do efeito ectópico de diferenciação²¹. Estudos recentes relataram tumorigênese indireta relacionada ao uso de células mesenquimais, em animais^{31,32,33}.

Alguns produtos poderiam persistir nos seres humanos durante um período prolongado após a administração ou ter um efeito prolongado ou permanente, mesmo depois do mesmo não estar mais presente. A maioria da aplicação dos produtos necessita de cirurgia ou outros procedimentos invasivos para o acesso ao sítio alvo. Além disso, produtos de origem alogênica têm o potencial de provocar respostas imunológicas (imunogenicidade). A indução de uma resposta imunológica poderia ser o efeito desejado de alguns produtos, tais como vacinas terapêuticas, no entanto, para outros, a imunogenicidade poderia ser um risco²⁴.

Sobre os dados de estudos pré-clínicos a clínicos, vários problemas poderiam tornar limitada a capacidade, por exemplo, de extrapolar as informações de segurança de uma célula

extensamente manipulada, a depender de vários fatores, tais como os modelos animais utilizados, a via de administração do produto, o perfil de biodistribuição, a resposta imune ao produto administrado e outros. A maioria das agências reguladoras têm discutido os estudos de ensaios clínicos de forma individualizada devido às especificidades envolvidas, principalmente quando estes produtos se destinam ao uso em seres humanos pela primeira vez. Neste caso, a avaliação da segurança necessariamente deveria incluir a avaliação da natureza e frequência de reações adversas potenciais e uma estimativa da relação com o volume - dose administrada^{34,35,36}.

O processamento celular é geralmente segmentado em uma série de etapas definidas de acordo com os tipos de células e com as necessidades específicas do produto. Um processo de BPF típico para produtos de terapias avançadas deveria seguir as seguintes etapas^{23,28}:

- Seleção do doador das células ou material de partida com realização de triagem laboratorial para marcadores de infecções transmissíveis por material biológico.
- Avaliação do material de partida (células, tecidos) obtido por doação, proveniente de banco de células e tecidos.
- Lavagem para remover células indesejáveis/inviáveis.
- Seleção/enriquecimento de células-alvo.
- Engenharia celular - ativação, modificação genética.
- Cultura celular - plataformas estáticas ou biorreatoras.
- Lavagem para remover impurezas.
- Formulação de produto - redução de volume e criopreservação.
- Armazenamento.
- Transporte final do produto e distribuição ao serviço de saúde para uso em paciente.

No caso de terapia gênica com uso de vetores, acrescentam-se às etapas supramencionadas a amplificação de vetores, a transfecção celular, transdução, purificação ou distinção de populações, microfiltração/ultrafiltração e transferência^{23,24}.

O Quadro descreve os principais pontos críticos da produção de um produto de terapia avançada, considerando os riscos envolvidos e as propostas de mitigação destes riscos, fundamentada nas premissas de BPF definidas por Abou-El-Enein et al.³⁸ e referenciadas em documento de Consulta Pública sobre o mesmo tema, divulgada pela EMA, em 2016³⁹.

Por fim, a descrição detalhada das condições de uso do produto de terapia avançada deve ser cuidadosamente elaborada e informada, pelo fabricante do produto, ao responsável pelo uso/aplicação do produto, devendo abarcar, inclusive, as especificações dos equipamentos e das características dos ambientes de manipulação^{37,39}. Os riscos relacionados a uma manipulação inadequada, pós-liberação do produto e anteriormente ao seu uso, tem



Quadro. Descrição dos riscos dos processos de produção de produtos de terapias avançadas com estratégias de mitigação. Brasil, 2017.

Pontos críticos	Análise de Risco	Mitigação
Matérias-primas	<ul style="list-style-type: none">Contaminação microbiana e viralVariabilidade do produto final	<ul style="list-style-type: none">Grau de pureza adequado ao uso pretendido - matérias-primas com grau farmacêuticoRastreabilidade das matérias-primasQualificação do fornecedor
Células primárias	<ul style="list-style-type: none">Infecção microbiana e viralDeterioração do material	<ul style="list-style-type: none">Termo de consentimento de doação voluntáriaTestes laboratoriais para detecção de agentes infecciosos aprovados pela autoridade sanitáriaAvaliação dos centros de coleta fornecedoresRotulagem e armazenamentoRastreabilidade
Bancos de Células	<ul style="list-style-type: none">Deterioração do materialContaminação cruzada	<ul style="list-style-type: none">Rotulagem e armazenamentoRastreabilidadeManipulação dedicada
Cultivo/Expansão	<ul style="list-style-type: none">Contaminação microbiana e viralAlterações genotípicas	<ul style="list-style-type: none">Controle de passagens no cultivoControle laboratorialProcessos validadosRotulagem e armazenamento adequadosRastreabilidade de estoques
Processamento	<ul style="list-style-type: none">Alta variabilidadeBaixa reprodutibilidadeDeterioração do produtoContaminação microbiana e viral (não esterilização final)	<ul style="list-style-type: none">Embalagem e rotulagemCriopreservaçãoControles de qualidade com testes adequadosFórmula de produção/Procedimentos operacionais validadosProdução em sistema fechadoManipulação estéril/ambientes limposControles ambientais definidosControle de mudançasAnálises de desvios e gestão de riscosLiberação controlada de loteManutenção de amostra analítica do produto final (se possível)Estudos de estabilidade do produto
Infraestrutura	<ul style="list-style-type: none">Contaminação cruzadaDeterioração do produtoContaminação microbiana e viralSegurança do trabalhador	<ul style="list-style-type: none">Sistema de tratamento de águaFluxos definidosProdução segregadaSistemas de tratamento de arProcessos de higienização/ descontaminação/esterilização ou filtração validadosSala de materiais replicados/vetores e sala de produtos infectados segregadosEquipamentos (biorreatores, colunas cromatográficas, irradiadores, ultracongeladores, tanques N2 etc.) qualificados e controladosTerceirização formalizada e auditada
Pessoal	<ul style="list-style-type: none">Ausência de controle de qualidade de processo, final e liberação de lote	<ul style="list-style-type: none">Qualificação e treinamento
Recall	<ul style="list-style-type: none">Uso de produtos inadequadosAgravamento da saúde do paciente	<ul style="list-style-type: none">Procedimentos definidos para recolhimento de produtosProcedimentos em casos de produtos não conformes já utilizados em pacientes
Resíduos	<ul style="list-style-type: none">Contaminação do ambiente	<ul style="list-style-type: none">Procedimentos de coleta e tratamento de resíduosAtenção especial a vetores (OGM)

o potencial de prejudicar a qualidade e a segurança do produto tanto quanto os riscos associados ao processo produtivo. Dentre as possíveis manipulações necessárias pré-utilização do produto consideradas mínimas, citam-se: descongelamento, lavagem, troca de tampão, centrifugação necessária para remover solução de preservação contendo agente crioprotetor, remoção de impurezas relacionadas ao processo (filtração para eliminar resíduos de solução de preservação ou células inviáveis), suspensão, dispersão, dissolução ou diluição com solvente/tampão, recuperação

de células após criopreservação, mistura do produto com células autólogas ou outro adjuvante, alíquotagem e adaptação de dose, carregamento em sistemas ou dispositivos cirúrgicos ou transferência para bolsa de infusão/seringa³⁷, dentre outros.

Destarte, a complexidade intrínseca ao desenvolvimento de um produto de terapia avançada deveria refletir em planos de desenvolvimento de produtos minuciosamente ajustados de acordo com a avaliação multifatorial dos riscos inerentes ao processo,



com o objetivo de identificar fatores associados aos impactos em qualidade e segurança do produto; determinar a extensão e o foco dos dados necessários durante o desenvolvimento de estudos não clínicos e clínicos; estabelecer processos de gerenciamento de riscos pré-mercado e pós-mercado, a serem especificados no plano de farmacovigilância³⁷. Importante considerar que as terapias avançadas têm, ademais, certa dimensão ética que não está presente nos tradicionais processos de desenvolvimento farmacêutico. Portanto, a progressão de ensaios pré-clínicos para estudos clínicos, sucedida, pela disponibilização de produtos aprovados à população precisa ser considerada dentro de um quadro histórico e ético do país³⁶.

CONCLUSÕES

A análise da literatura científica demonstrou avanços significativos nos estudos com células humanas frente ao seu potencial terapêutico, embora persista ainda certo nível de incerteza dos riscos envolvidos no uso dos produtos de terapias avançadas a longo prazo. A previsibilidade reduzida quanto aos estudos pré-clínicos limita a disponibilização dos respectivos produtos para uso em humanos. Até este momento percebe-se a falta ou carência de harmonização de protocolos relativos à obtenção de células ou tecidos, aos métodos de isolamento, cultivo e expansão celular, à caracterização e aos controles de qualidade de produtos intermediários e finais. FDA e EMA despenderam esforços, de forma bastante exitosa, com o objetivo de estabelecer regras relativas

aos produtos de terapias avançadas, compatíveis com as BPF e a condução de ensaios clínicos. Da mesma forma, a comunidade científica mostrou-se empenhada em desenvolver ferramentas avançadas para estudos das células em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Alguns desafios descritos, tais como a variabilidade intrínseca relacionada à fonte dos materiais biológicos, dificultam a demonstração da homogeneidade do produto, bem como condicionam o tamanho limitado de lote e o tempo curto de meia-vida, repercutindo, de certo modo em parâmetros relevantes tais como na realização de testes de controle extensivos. Além disso, a realização de ensaios clínicos controlados randomizados pode nem sempre ser viável, por exemplo, se a administração do produto requer um procedimento cirúrgico invasivo e de alto risco.

Outro ponto é a dificuldade da translação dos procedimentos de pesquisa básica para a produção em larga escala para uso em seres humanos, principalmente pela falta de *expertise* em processos regulatórios. Neste aspecto, é possível concluir que os instrumentos regulatórios devem ser otimizados, de forma a mostrarem-se dinâmicos, visto que as terapias avançadas são um campo da medicina sujeito a um rápido progresso científico. Desse modo, as agências reguladoras devem revisar e racionalizar os requisitos para registros de comercialização e autorizações de uso dos produtos para garantir que as regras aplicáveis sejam proporcionais e bem adaptadas às características específicas dos produtos de terapias avançadas.

REFERÊNCIAS

1. Catão M Ó. Biodireito: transplante de órgãos humanos e direitos da personalidade. São Paulo: Madras; 2004.
2. World Health Organization - WHO. First global consultation on regulatory requirements for human cells and tissues for transplantation report, 2004 Nov 29-Dec 01; Ottawa, Canada. Geneve: World Health Organization; 2015[acesso 15 jul 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/transplantation/ReportOttawaCTTx.pdf>
3. World Health Organization - WHO. Second global consultation on regulatory requirements for human cells and tissues for transplantation: towards global harmonization through graduated standards, 2006 June 7-9; Geneva, Switzerland. Geneve: World Health Organization; 2006.
4. Ministério da Saúde (BR). Relatório anual de gestão da Secretaria de Atenção a Saúde (SAS). Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2017.
5. Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos - ABTO. Organ Transplantation Brazilian: 2009- 2016. Braz Transpl Registry. 2016[acesso jun 2017]. Disponível em: http://abto.org.br/abtov03_ingles/Upload/file/BrazilianTransplantationRegistry/Ingles2016-lib.pdf
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Hemoprod 2014 e 2015. Bol Prod Hemoterápica. 2017 mar;(4).
7. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. Regen Med. 2008;3(1):1-5. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1>
8. Mason C, Manzotti E. Regen: the industry responsible for cell-based therapies. Regen Med. 2009;4(6):783-5. <https://doi.org/10.2217/rme.09.72>
9. Ancans J. Cell therapy medicinal product regulatory framework in Europe and its application for MSC-based therapy development. Front Immunol. 2012;3:253. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00253>
10. European Union. Regulation (EC) N° 1394/2007. Advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) N° 726/2004. Paris: European Union; 2007 [acesso 12 out 2017]. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:0137:en:PDF>
11. Hanna E, Rémuzat C, Auquier P, Toumi M. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. J Mark Access Health Policy. 2016;4. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v4.31036>
12. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Minimal manipulation of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products: draft guidance. Silver Springer: Food and Drug Administration; 2014[acesso em 16 out 2017]. Disponível em: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm427692.htm>



13. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry: guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. Silver Springer: Food and Drug Administration; 1998[acesso em 16 out 2017]. Disponível em: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072987.htm>
14. Gálvez P, Clares B, Hmadcha A et al. Development of a cell-based medicinal product: regulatory structures in the European Union. *Br Med Bull.* 2013;105(1):85-105. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds036>
15. Schneider C K, Salmikangas P, Jilma B, Flamion B, Todorova LR, Paphitou A et al. Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:195-201. <https://doi.org/10.1038/nrd3052>
16. European Union. Report from the Commission to the European Parliament and the Council in accordance with Article 25 of Regulation (EC) 1394/2007 of the European Parliament and of the Council on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) 726/2004. Brussels: European Union; 2014.
17. World Health Organization - WHO. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP). Geneva: World Health Organization; 1997.
18. Williams DJ, Thomas RJ, Hourd PC, Chandra A, Ratcliffe E, Liu Y, Rayment EA et al. Precision manufacturing for clinical-quality regenerative medicines. *Philosophical Trans A Math Phys Eng Sci.* 2012;370 (1973):3924-49. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0049>
19. Au P, Hursh DA, Lim A, Moos, MC Jr, Oh, SS, Schneider BC et al. FDA oversight of cell therapy clinical trials. *Science Translat Med.* 2012;4(149):149f31. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004131>
20. D'Ippolito G, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Exp Hematol.* 2006;34(11):1608-10. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.07.016>
21. Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med.* 2011;9:29. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-29>
22. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells.* 2009;27(9):2331-41. <https://doi.org/10.1002/stem.139>
23. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(5):673-91. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.763925>
24. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion.* 2014;54(5):1418-37. <https://doi.org/10.1111/trf.12421>
25. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *J Transl Med.* 2010;8:131. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-131>
26. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):709-16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>
27. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell.* 2012;10(3):244-58. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.005>
28. Barkholt L, Flory E, Jekerle V, Lucas-Samuel S, Ahnert P, Bisset L et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies: bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy.* 2013;15(7):753-9. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.005>
29. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis.* 2013;4(12):e950. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.480>
30. Williams DJ, Thomas RJ, Hourd PC, Chandra A, Ratcliffe E, Liu Y et al. Precision manufacturing for clinical-quality regenerative medicines. *Philosophical Trans A Math Phys Eng Sci.* 2012;370 (1973):3924-49. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0049>
31. Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp Gerontol.* 2008;43(11):1018-23. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.07.004>
32. Momin EN, Vela G, Zaidi HA, Quiñones-Hinojosa A. The oncogenic potential of mesenchymal stem cells in the treatment of cancer: directions for future research. *Curr Immunol Rev.* 2010;6(2):137-48. <https://doi.org/10.2174/157339510791117178>
33. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experimente to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;8:4-20.
34. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H et al.; Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood.* 2010;115(8):1549-53. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-219907>
35. Sensebé L. Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2013;15(11):1307-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.09.001>
36. Mathews DJ, Sugarman J, Bok H, Blass DM, Coyle JT, Duggan P et al. Cell-based interventions for neurologic conditions: ethical challenges for early human trials. *Neurology.* 2008;71(4):288-93. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000316436.13659.80>
37. European Union. European Medicines Agency. Guideline on human cell-based medicinal products. Paris: European Medicine Agency; 2006.
38. Abou-El-Enei M, Römhild A, Kaiser D et al. Good Manufacturing Practices (GMP) manufacturing of advanced therapy medicinal products: a novel tailored model for optimizing performance and estimating costs. *Cytotherapy.* 2013;15(3):362-83. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.09.006>



39. European Union. European Medicines Agency. Consultation document good manufacturing practice for advanced therapy medicinal products. Paris: European Medicine

Agency; 2016[acesso 17 out 2017]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/advtherapies/2016_06_pc/2016_06_draft_guideline.pdf

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.

Human cardiomyocytes for drug discovery

Cardiomiócitos humanos para descoberta de drogas

Diogo Gonçalves Biagi^I

Jéssica Gonçalves^I

Estela Cruvinel^I

Renata Damiani^{II}

Flavia Valgode^{II}

Fabiana Medeiros^{II}

Camila G Moreira^{III}

Evelyn Santos^{III}

Rodrigo Marcon^{III}

Calixto João^{III}

Gabriela Venturini^{IV}

Alexandre Pereira^{IV}

Éden Ferreira^V

Renato Mortara^V

Marcos C Valadares^I

ABSTRACT

Introduction: Cardiac drug discovery are based in old methods that use animals, animal cells or modified cells that do not faithfully represent human cardiac phenotypes. **Objective:** Here, we aimed to show that cardiomyocytes derived from human iPSCs represent a new tool for cardiac drug discovery and could contribute to reduce animal use in research. **Method:** Generation of human iPSCs derived cardiomyocytes and its use for cardiotoxicity evaluation and infection with *T. cruzi* for drug discovery. **Results:** Definition of robust protocol for human iPSCs reprogramming, maintenance and cardiac differentiation. Derivation of high purity cardiomyocytes from hiPSCs that presented toxicity to different doses of doxorubicin and were amenable to infection of *T. cruzi*. **Conclusions:** Human cardiomyocytes derived from human iPSCs can be a great tool for drug discovery and can replace several assays done in animals helping to reduce animal use in research.

KEYWORDS: Human Cardiomyocytes; Drug Discovery; Doxorubicin; Animal Replacement

RESUMO

Introdução: A descoberta de novas drogas para doenças cardíacas é baseada em métodos antigos que usam animais, células de animais ou células modificadas que não representam fielmente fenótipos cardíacos humanos. **Objetivo:** Neste trabalho, temos o objetivo de mostrar que cardiomiócitos derivados de células iPSCs humanas representam uma nova ferramenta para a descoberta de drogas cardíacas e poderiam ajudar na diminuição do uso de animais na pesquisa. **Método:** Geração de cardiomiócitos derivados de células iPSCs e seus usos para avaliação de toxicidade cardíaca e infecção por *Trypanosoma cruzi* para descoberta de drogas. **Resultados:** Definição de um protocolo robusto de reprogramação, manutenção e diferenciação de células iPSCs. Diferenciação de células iPSCs em cardiomiócitos com alta pureza que apresentam toxicidade a diferentes doses de doxorubicina foram suscetíveis a infecção com *T. cruzi*. **Conclusões:** Cardiomiócitos humanos derivados de células iPSCs podem ser uma potente ferramenta para descoberta de novas drogas e podem substituir diversos ensaios feitos em animais ajudando a diminuir o uso de animais em pesquisa.

PALAVRAS-CHAVE: Cardiomiócitos Humanos; Descoberta de Drogas; Doxorubicina; Substituição de Animais

^I PluriCell Biotech, São Paulo, SP, Brazil

^{II} Biosíntesis Laboratory, São Paulo, SP, Brazil

^{III} Centro de Inovação e Ensaios pré-Clínicos (CIEnP), Florianópolis, SC, Brazil

^{IV} Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil.

^V Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

* E-mail: diogo.biagi@pluricellbiotech.com



INTRODUCTION

Since early 1920, animals have been used as models to evaluate toxicity of compounds before human use¹. This is important to prevent harsh and dangerous side effects due to the administration of unknown drugs to humans. For more than 40 years, the toxicological field has evolved little in respect to the traditional way of measuring the toxicity of new compounds in animals, relying basically on the administration of different dosage (chronic or acute) to a large number of animals to observe tissue distribution and pathological implications of the drug use¹.

Although very established and with unparalleled characteristics, *in vivo* pre-clinical safety and toxicological studies have remained costly, time consuming and, for some tissues (like heart, liver and brain), very superficial. Not surprisingly, problems in heart and liver account for almost 50% of the causes of drug attrition rate², that is, when drugs fail in human tests (clinical trials), despite the fact that were previously thought to be safe in pre-clinical testing. This serves to show that we are in need of new tools that are able to evaluate more precisely toxicity and safety aspects of new drugs preferably in an efficient, high throughput and cheaper way than *in vivo* animal testing.

Since the advent of the human induced pluripotent stem cells (so called iPSCs) by Takahashi et al. in 2007³, the scientific community has heralded iPSCs as disruptive. Being able to induce pluripotency from adult cells from different donors open the avenue for a much-needed evolution in cellular models for normal and diseased tissues. Scientific community has always had problems in accessing various tissues types from donors. Tissues such as heart and brain are very scarce and hampered the advance of scientific knowledge about them. However, with iPSCs (and differentiation protocols)⁴, scientists are now able to obtain large amount of cells, from different tissues and genetic backgrounds (donors), including diseased ones⁵. Looking at this perspective, many institutions around the world have financed induced pluripotent stem cell banks that offer access to a great variety of material⁵.

Looking at this perspective, establishing a robust and powerful protocol for heart cell differentiation from iPSCs will provide a new tool to access cardiotoxic profiles of new compounds being developed for therapeutic applications. Our goal was to efficiently differentiate human induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) into cardiomyocytes with high purity and robustness and evaluate their use for drug cardiotoxicity.

METHOD

iPSCs reprogramming and maintenance

Erythroblasts were cultured in a serum-free mononuclear cell (MNC) medium containing the following cytokines diluted in Stem Span Serum Free Expansion Medium (Stem Cell Technologies, USA): insulin-like growth factor 1 (IGF-1): 40 ng/ml; Stem Cell Factor (SCF): 100 ng/ml; Interleukin 3 (IL-3): 10 ng/ml; erythropoietin (EPO): 2 U/ml (all cytokines are from R&D Systems, EUA). Two million cells

were transfected with plasmids pEB-C5 and pEB-Tg (Addgene, USA), containing reprogramming factors Oct4, Sox2, Klf4, cMyc, Lin28 and SV40-T, using the Human CD34+ nucleofector kit and the Nucleofector II device, both by Lonza (Basel, Switzerland) following manufacturer's instructions. Reprogrammed erythroblasts were incubated in MEF-coated plates in MEF medium and FBS ES-Cell Qualified (Thermo Fisher, USA) with basic fibroblast growth factor (bFGF; 20 ng/ml) overnight. Then, they were transferred into embryonic stem cell (ESC) medium containing Knockout DMEM, Knockout Serum replacement, Antibiotic-antimycotic, Glutamax 200 mM, MEM non-essential amino acid solution, 2-mercaptoethanol supplemented with bFGF (20 ng/ml) (all from Thermo Fisher, USA) and Sodium butyrate (0.25 mM) (Cayman, USA). hiPSC colonies were passaged from a 6-well MEF-coated plate into Matrigel (BD)-coated plates with E8 medium (Thermo Fisher, USA), using Gentle Cell Dissociation Reagent (Stem Cell Technologies, USA) and 10 μ M ROCK inhibitor Y-27632 (Stemgent, USA).

For maintenance, colonies were passaged twice per week with Versene (Thermo Fisher, USA), following manufacturer's instruction, and plated as single-cells in a concentration of $2,5 \times 10^5$ cells/cm². E8 media (Thermo Fisher, USA) was used during the week and E8 flex (Thermo Fisher, USA) during the weekend. hiPSCs were routinely tested for mycoplasma and none contamination was detected.

Cardiac differentiation of hiPSCs

iPSCs were differentiated using a monolayer differentiation method modified from previous reports^{6,7}. iPSCs were grown in feeder-free conditions until they reached 60%-70% confluence. Cells were singularized, counted and plated ($2,5 \times 10^5$ cells/cm²) E8 with 5 μ M of Ri (Cayman, USA). E8 medium was changed daily until cells reached 100% confluence. This day was considered day 0 and medium was changed to RPMI supplemented with 1X B27 supplement (Thermo Fisher, USA) without insulin (RB-) and 4 μ M of CHIR99021 (Merck, USA). 24 hours later, medium was changed to RB- supplemented with 10 ng/mL BMP4 (R&D Systems, USA). In day 2, medium was changed to fresh RB- supplemented with 2,5 μ M of KY2111 and XAV939 (both from Cayman). At day 4 and every two days, medium was changed to fresh CDM3⁷. Cells were grown for 30 days when passaged as single-cells to specific experiments.

Embryoid bodies formation

Embryoid Bodies (EB) were generated as described by Lin and Chen⁸ with minor modifications. Briefly, cells were cultured until reach 90% confluence and passage with Dispase (StemCell Technologies, USA), after complete dissociation, PBS (LGC Technologies, Brazil) were added and a gently up and down pipetting was performed to break big colonies. Cells were transferred to 15 mL tubes washed twice with PBS after centrifugation 100 x g for 2 minutes. Pellets were gently resuspended in E8 media supplemented with 4 μ g/mL of PVA (Sigma, USA) and cultivated in non-adherent plates (Sarstedt, German) for 1 day. Medium was changed to E6 (Thermo Fisher, USA) carefully to not remove EB



in suspension. Half of the medium was changed every 3 days until day 13, when RNA was collected using Trizol (Thermo Fisher, USA).

rt-PCR and qPCR

All procedures followed manufactures' instructions. For cDNA synthesis were used Promega's GoScript Reverse Transcription System # A5001, samples were diluted for 10 ng/mL. For the endpoint PCR were used Promega's GoTaq DNA Polimerase # m3008 and for quantitative PCR was used Power SyBer Green Master Mix PCR #4367659. Primers sequences are available upon request.

Karyotype

iPS cell were grown in a 60 mm plate to reach 90% confluence. At this moment, cells were detached using Versene and collected in a 15 mL tube. Cells were treated with E8 supplemented with Colcemid (20 ng/mL) (Thermo Fisher, USA) for 1 hour in 37°C, washed with PBS and treated for 20 minutes 37°C with hypotonic solution (PBS supplemented with KCl 0,075 M). Cells were wash with PBS and a fixation step was performed. Fixation solution was Methanol: Acetic acid (3:1). All centrifugation steps were 200 x g for 4 minutes. Conventional chromosome analysis was performed on iPSCs cultures, using GTG banding at 400-band resolution according to standard protocols. A total of 10 metaphase cells were analyzed. Cell images were captured using the CytoVysion system (Applied Imaging Corporation, USA).

Immunofluorescence

iPS cells were plated in 96-well plates coated with Geltrex and cultivated for 2 days until 50% confluence. They were fixed with 4% PFA and stained with OCT4 (Santa Cruz # sc5279; 1:100 dilution), NANOG (R&D # af1997; 1:25 dilution) and TRA1-81 (Stemgent # 09-0006; dilution 1:100) antibodies and DAPI (Sigma, USA) to show nuclei. Image was generated in EVOS FL (Thermo Fisher, USA).

Flow Cytometry

For iPS cytometry, cells were grown until they reach 70-80% confluence and passaged with Versene. BD Stemflow #560589 was used following manufacturer's instructions.

Cardiomyocytes were plated in 6-well plates coated with Geltrex and cultivated for 7 days. After cell dissociation, they were fixed with 4% PFA and stained with anti-cardiac Troponin T (Fitzgerald # 20R-3024, dilution 1:10000), Myosin (AbCam # ab207926, dilution 1:4000), alfa-actinin (AbCam # AB9465, dilution 1:4000) and cardiac troponin I (BD # 564409, dilution 1:400) antibodies. Titration of antibody was done until no staining was found in iPS cells. For iPSCs and cardiomyocytes, data was acquired using Canto BD equipment and analyzed by FlowJo Software considering 2% of false positive events.

Cardiotoxicity assays

In Biosintesis toxicity test, three different batches of cardiomyocytes (05C146, 05C138, 05C146) were exposed to DMSO (20%) and Doxorubicin (1 and 10 µM) in 96-well plates. Toxicities of the substances were evaluated after 48 h of exposure using Neutral Red dye.

In CIEnP (Centro de Inovação e Ensaios pré-clínicos) toxicity test, three different batches of cardiomyocytes (05C022, 05C014, 05C065) were exposed to Doxorubicin (1 and 10 µM) in 96-well plates. Toxicities of the substances were evaluated after 48h of exposure using MTT⁹ and Neutral Red¹⁰ dye, for both the absorbance was measured using SpectraMax i3X (Molecular Devices). Results were shown using percentage of live cells related to control group treated with the vehicle.

Statistic

CIEnP data: data were expressed as mean ± standard error. To evaluate the significant differences between groups, an on way ANOVA followed by Newman-Keuls test was performed. Values below 0,05 were considered as an indication of significance. Analysis were carried out by GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, USA).

Biosintesis data: The calculation of cellular viability in percentage (CV%) was done according to the formula:

$$CV\% = \frac{(\text{Average of Optical Density readings of the test substance / reference substance})}{\text{Average of Optical Density readings of the cell control}} * 100$$

Results of cardiotoxicity were subjected to ANOVA One-way variance analysis. Statistical difference among the groups was checked in the Bonferroni test with a reliability interval of 95%.

Trypanosoma cruzi culture

Trypomastigote infection: *T. cruzi* trypomastigotes (Y strain labelled with GFP)¹¹ were derived from the supernatants of infected LLC-MK2 culture cells (ATCC CCL-7; American Type Culture Collection, Rockville, MD). Cells were cultivated with RPMI 1640 medium plus 10% fetal bovine serum (FBS), at 37°C in 5% CO₂. Free trypomastigote forms are found in the cell supernatants daily. Supernatant was harvest, centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and pellet was resuspended in RPMI media supplemented with B27 for cardiomyocyte infection. Cardiomyocytes were incubated during 24 hours with RPMI media supplemented with B27 containing 2.5 x 10⁵ trypomastigotes (MOI 5:1). After 24 hours of infection, the parasites were discarded and the cells were washed 3 times with PBS, followed by addition of RPMI media supplemented with B27 free of parasites. Cells were cultivated for another 24 hours, up to 48 hours of infection.

Staining

After 48 hours of infection, cells were washed 3 times with PBS and fixed with 4% PFA for 30 minutes. PFA was discarded and cells were washed 3 times with PBS. Cells were incubated for one hour with DAPI (NucBlue - Molecular Probes) to stain nuclei and Alexa Fluor 555 phalloidin (Invitrogen) for actin staining. After staining, cells were washed with PBS and kept at 4°C until image acquisition in the Cellomics® ArrayScan® VTI High Content Analysis Reader with automatic autofocus acquisition of 50 pictures per well under 40X magnification.



Amastigotes infection: Cardiomyocytes attached to laminin-coated glass coverslips were infected with G strain extracellular amastigotes from *T. cruzi* as previously described¹². After 72 hours, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and parasites labeled with a human chagasic serum (with Alexa-488 anti-human Ig (Thermo Fisher, USA), in green), actin filaments stained with phalloidin-TRITC (Thermo Fisher, USA) and DAPI (Thermo Fisher, USA) was used to label nuclei and kinetoplasts.

RESULTS

Generation of human iPS Cells

Erythroblast from a healthy donor (ACP) were reprogrammed using episomal vectors. iPS ACP5 clone was collected after colonies formation during reprogramming and expanded. Figure 1A shows flow cytometry analysis of hiPSCs transcription factors

markers, cells show high positive staining for all markers even after long-term cultivation (50 passages). Transcription factors and membrane markers are also showed by immunofluorescence in Figure 1B. ACP5 shows expression of pluripotency markers genes for hiPSC (Figure 1C). To validate our method of passing as single-cells, we run karyotype analysis during long term cultivation, ACP5 clone presented normal karyotype until passage 50 (Figure 2A).

Finally, initial *in vitro* differentiation capability was evaluated by spontaneous differentiation of EB, after 13 days in suspension culture with no compound to induce specific differentiation. RT-PCR shows that differentiated cells expressed endoderm (AFP), mesoderm (BRACHURY and MSX1) and ectoderm (PAX6) markers (Figure 2B) demonstrating ACP5 clone can differentiate into the three germ layers *in vitro*. Taking together, these data confirm that our reprogramming and cultivation process of

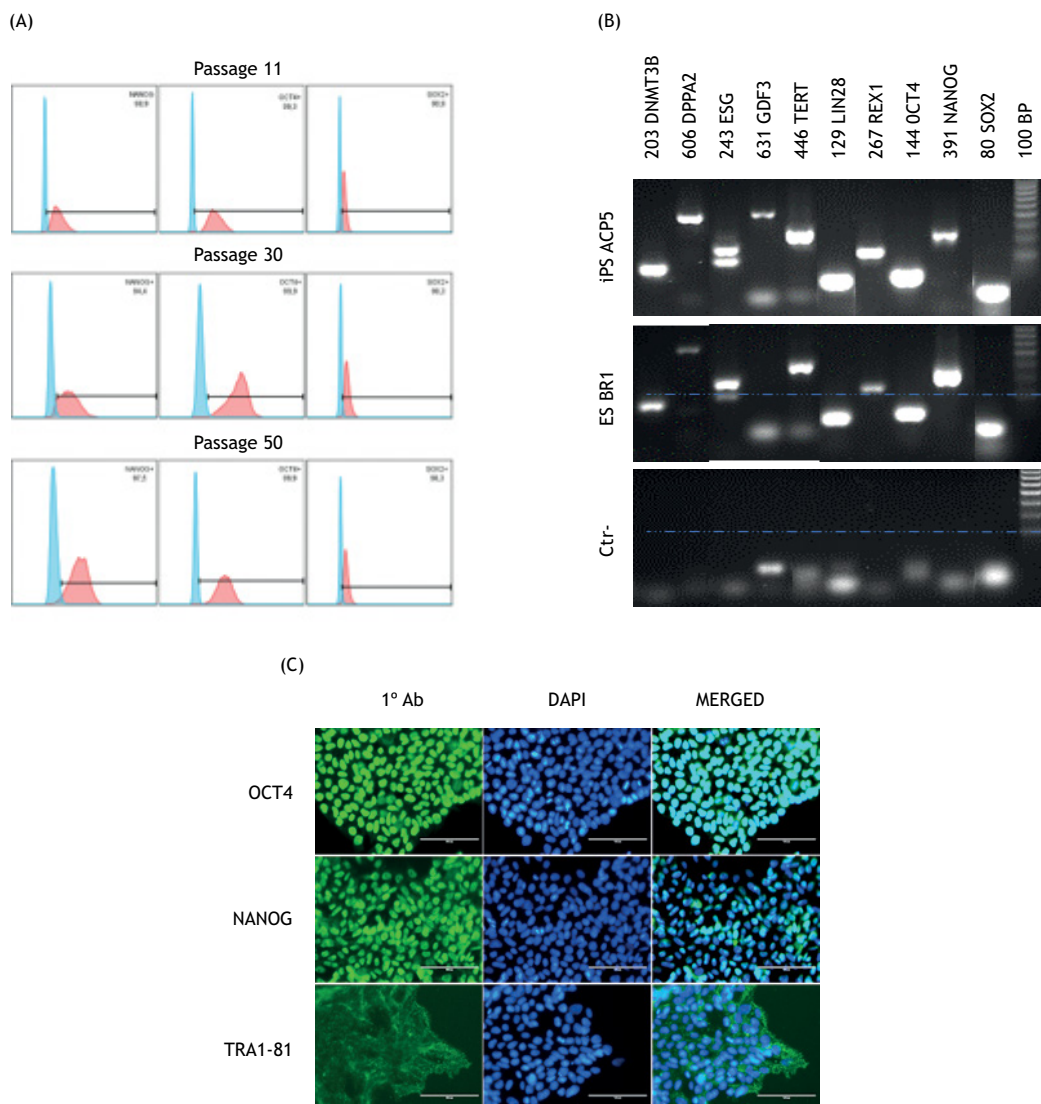


Figure 1. iPSCs characterization; (A) Flow Cytometry for pluripotency nuclear markers at passages 11, 30 and 50; (B) endpoint PCR for pluripotency markers (DNMT3B = 203 bp); (DPPA2 = 606 bp); (ESG = 243 bp); (GDF3 = 631 bp); (TERT = 446 bp); (LIN28 = 129 bp); (REX1 = 267 bp); (OCT4 = 144 bp); (NANOG = 391 bp) (Control 100 bp); (C) Immunofluorescence of pluripotency markers (OCT4, NANOG and TRA1-81). DAPI stain for the nucleus and MERGED stands for markers and nucleus staining together, scale bar: 100 μm.

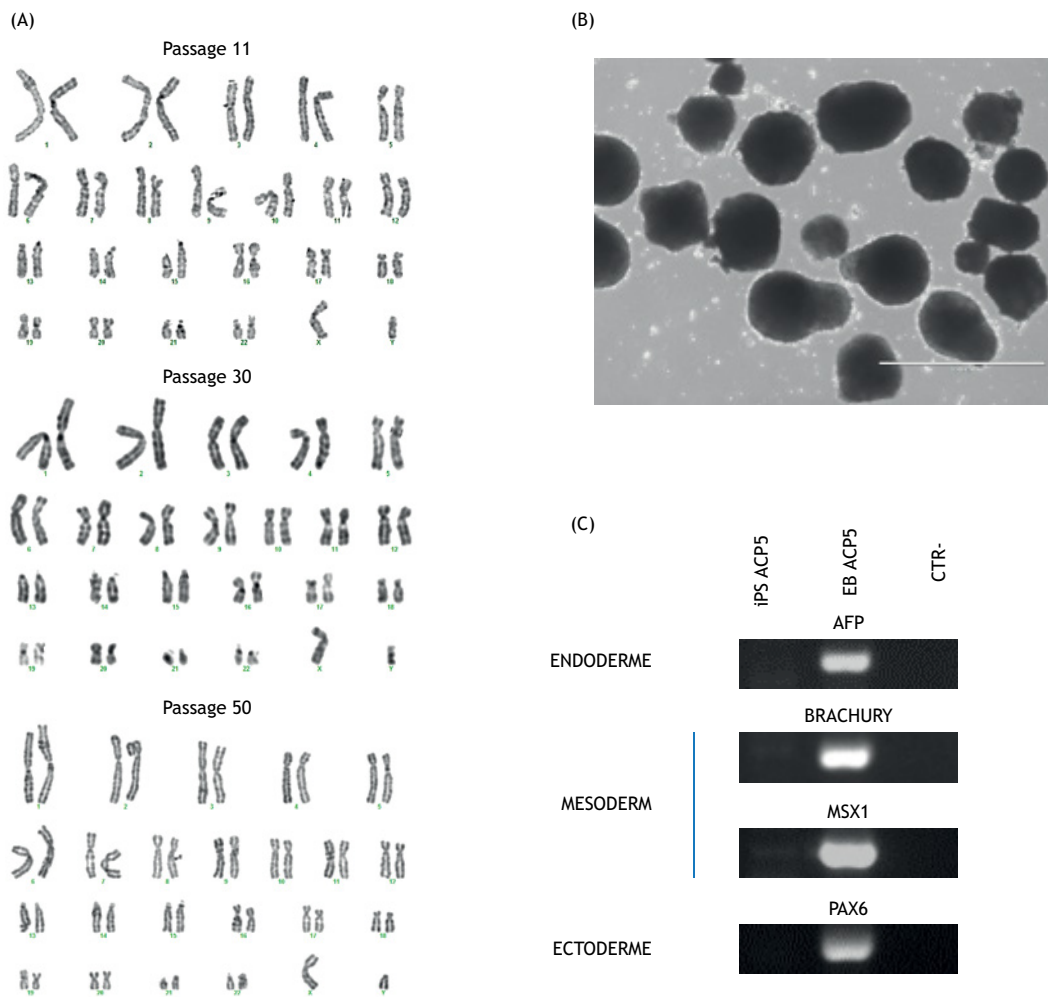


Figure 2. iPS characterization. (A) Normal karyotypes during long term cultivation at passages 11, 30 and 50. (B) Embryoid body formation, scale bar 1000 μ m. (C) endpoint PCR for the three lineages derivatives markers: Endoderm - marker AFP; Mesoderm - markers BRACHURY and MSX1 and Ectoderm - marker PAX6..

hiPSCs have high reproducibility and generated cells with good quality capable to differentiate in any cell type.

Cardiac differentiation of hiPSCs and its use for drug discovery

iPS ACP5 clone was then used to generate human iPSCs derived cardiomyocytes (iPSC-CM). Cells from passage 20 to 60 were used resulting in equally efficient cardiomyocyte differentiation (<https://youtu.be/07Thu63V-5o>). We show by flow cytometry the percentage of cardiac specific Troponin T expression (TNNT2 gene) in different passages (Figure 3A). Highly pure iPSC-CM population (above of 90%) was achieved regardless hiPSCs passage. Using hiPSC-CMs derived from hiPSCs at passage 60, we also show the presence of other specific cardiac proteins as α -actinin (ACTN2); heavy-chain myosin (MYH7) and the mature form of Troponin I (TNNI3) (Figure 3B).

We next used cardiomyocytes with purity above 90% for the cardiac troponin T protein (Figure 4A and C) to see if these cardiomyocytes could be able to recapitulate doxorubicin cardiotoxicity.

We ran different analysis in two different laboratories that performed the assays under Good Laboratory Practice (GLP) conditions. Figure 4B (upper panel) shows doxorubicin toxicity assay performed by Biosintesis. Figure 4D (lower panel) shows doxorubicin toxicity assay performed by CIEnP. In both analysis, different concentrations of doxorubicin resulted in different levels of cardiotoxicity. Figures 4E-4H show the effect of different in-development possible drugs (the names are confidential) not related to heart diseases in human cardiomyocytes, for some drugs, toxicity was observed in low and high doses; and for other drugs, toxicity was only observed in higher doses. Taken together, these data suggest that cardiomyocyte generated from clone ACP5 can offer a great and reliable cell assay to test human cardiotoxicity.

Finally, we evaluated if human cardiomyocytes derived from iPSCs could be infected with *T. cruzi*. Figure 5 shows efficient infection despite the *T. cruzi* form used for the infection, both trypomastigotes (A) and amastigotes (B) forms successfully infected the cells. Cardiomyocytes continue beating even after nine days of infection (<https://youtu.be/SjRsB0sjd-M>).

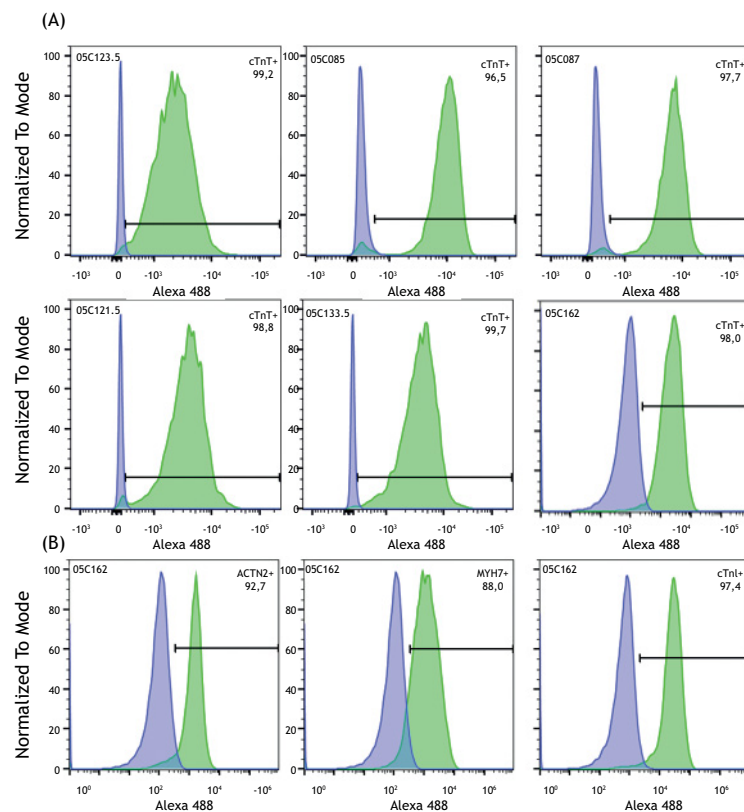


Figure 3. (A) Flow Cytometry of cardiac Troponin T (cTnT) for different batches of differentiation. (B) Flow cytometry of α -actinin (ACTN2), myosin heavy-chain (MYH7) and adult form of cardiac troponin I (cTnI). Numbers inside the chart in upper left position indicate lot, in upper right position indicate percentage of positive cells.

DISCUSSION

In this study, we have shown reliable reprogramming of blood from a single patient using non-viral and non-integrative approaches (Figure 1). Non-integrative approaches are desirable to prevent genetic modification of the cell line that could potentially damage an important component of the cell. Our results show that the lineage ACP5 has been faithfully reprogrammed showing all the basic characteristics of a pluripotent cell line reported in the literature such as expression of the key markers, morphology and genomic stability (Figure 2 and Heng and Fussenegger¹³). Karyotype analysis was carried out in different cell passages and cultivation up to passage 50 confirming genomic stability, which is in accordance to the literature¹⁴.

As for the cardiomyocyte differentiation protocol, we have been able to show that the cells obtained under our proprietary process are reliable and show the basic characteristics necessary for identification of cardiotoxic compounds (Figure 4). Doxorubicin is an anthracyclin used as an antineoplastic drug that has been demonstrated to clinically induce cardiotoxicity in a fraction of the treated patients¹⁵. In this study, we have shown that our cells respond to biological relevant doses of doxorubicin by undergoing cell death. It is important to note that the tests were done with 2 different partners (CiEnP e

Biosintesis), both of which work under GLP conditions and performed the test according to reference guidelines.

We have also been able to show that our cells are amenable to infection by *T. cruzi*, the infectious agent of Chagas' disease (Figure 5 and <https://youtu.be/SjRsB0sjd-M>), a major research interest among Brazilian scientific community for its public health impact. By developing this new model, we are able to bring many advantages to build upon the work of the Chagas disease scientific community, such as: 1) a more relevant model, by using human heart cells instead of dealing with the differences between animal and human heart cells; 2) replacing animal use by offering an alternative method that relies solely on human cells; 3) increased experimental reproducibility by offering the same cells and the same donor (genetic background); 4) possibility of accessing genetic differences that could be the cause of clinical variability of disease symptoms; 5) production of unlimited amount of cells and adaptation to high throughput drug screening platforms.

Taking all the information together, we can conclude that human iPSCs and cardiomyocytes derived from iPSCs are excellent research tools that should be supported by not only the Brazilian scientific community but also by its regulatory framework. As mentioned before, we are dealing with human biological material (cells) that have undergone extensive laboratory

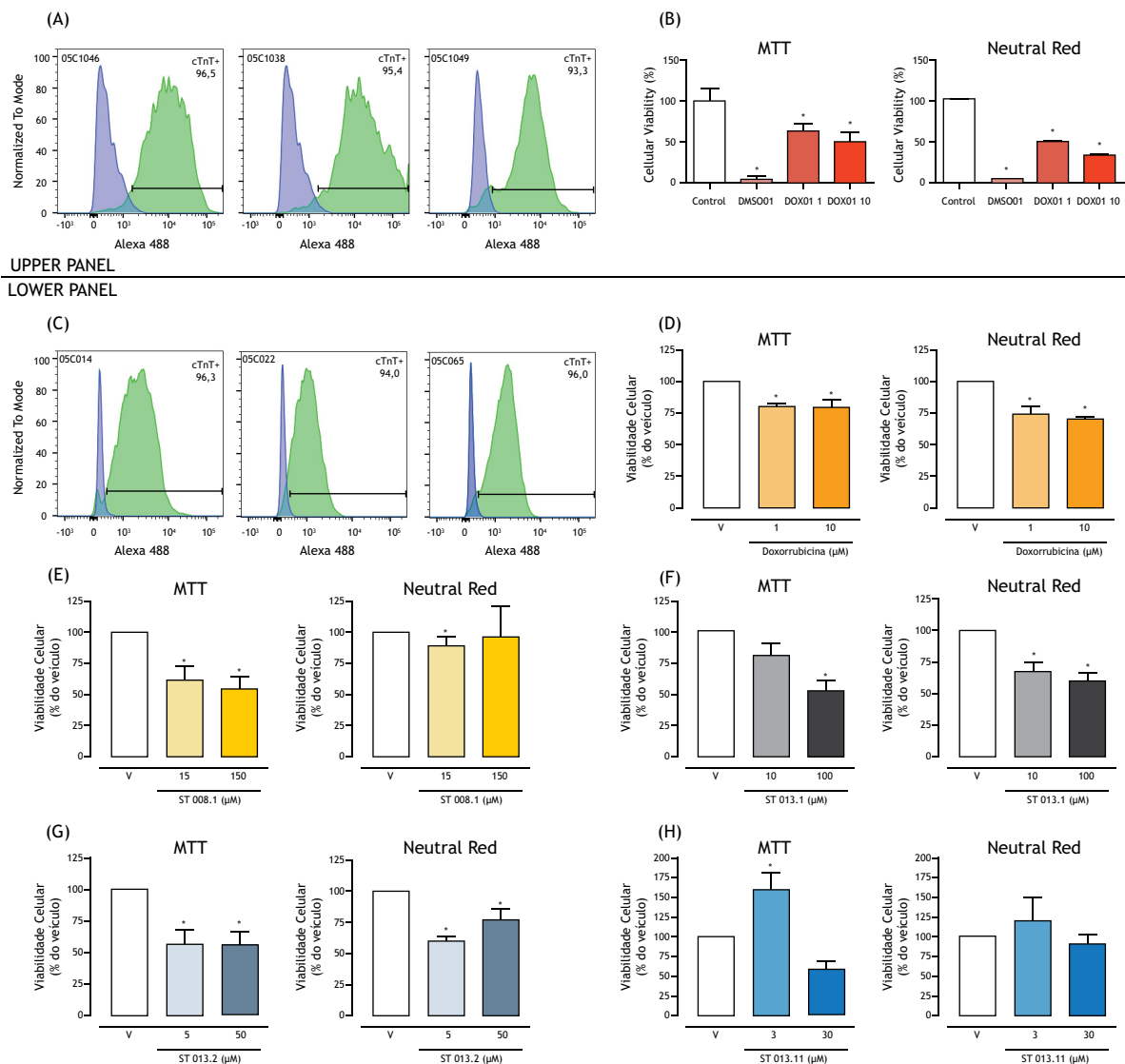


Figure 4. Upper panel; (A) Flow Cytometry of cardiac Troponin T (cTnT) for different batches of differentiation and (B) Biosynthesis' MTT and Neutral Red analysis of doxorubicin toxicity Doxo 1 and Doxo 10 stands for 10 μ M and 10 μ M of doxorubicin treatment. Lower panel; (C) Flow Cytometry of cardiac Troponin T for different batches of differentiation; (D) CIEnP's MTT and Neutral Red analysis of doxorubicin toxicity; and (E-H) CIEnP's MTT and Neutral Red analysis for possible new drugs not related with cardiac diseases. For flow cytometry, numbers inside the charts in upper left position indicate lot, in upper right position indicate percentage of positive cells.

manipulations to acquire the specific properties discussed in this publication. Internationally, these biological reagents are faced by regulatory agencies as RESEARCH USE ONLY (RUO) products, that is, they do not need any market registration or clearance from the regulatory agency to be commercialized. RUO label carries the understanding that the product is not allowed for human or diagnostic use. It is the seller's responsibility to provide that information and the buyer's responsibility to abide in it as well and make correct use of the product. In Brazil, the Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) has already issued a Director Collegiate Resolution (RDC) that allows RESEARCH USE ONLY products to be commercialized in the country without the need for registration¹⁶. It is of clear understanding that the biological reagents reported in this publication fits exactly the aforementioned description.

It is important to highlight the importance of facing these biological reagents (human cells) as a commercial product as well. It may be argued that cells cannot be commercialized in Brazil for our constitution has prohibited such endeavor (art 199, #4). We suggest here that this understanding of the constitution had been surpassed and should be updated to reflect later advances in the scientific field, such as the advent of iPSCs, discussed in this publication. The Federal Attorney General's Office (Advocacia Geral da União) has publicly stated that it is not forbidden to commercialize biological products (human cells) that have undergone extensive manipulations in the laboratory (as to exclude the intention of commodification of body parts) because, due to technological advances, the commercialization of these biological products could lead, in the future, to outstanding medical and therapeutic applications (http://bit.ly/AGU_parecer). We

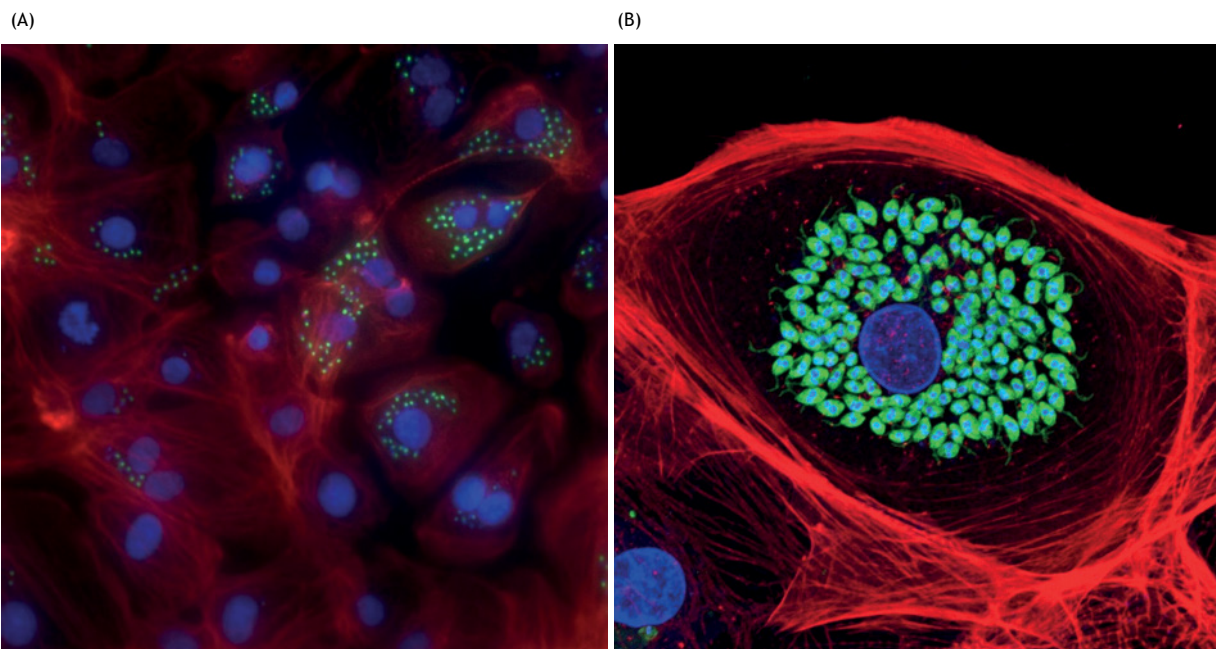


Figure 5. (A) Cardiomyocytes infection with *T. cruzi* in the trypomastigotes form, zoom 20X. (B) Cardiomyocytes infection with amastigotes form, zoom 100X. Red stain Actin, green are modified *T. cruzi* and Blue stain nuclei and kinetoplast.

enforce and echo this rationale, as this would open the gates for great biotechnological progress to our country, bringing legal certainty and investment opportunities.

It is well known by the Brazilian scientific community that there are no impediments (either ethical nor regulatory) to import human cells from abroad. Being the only requirement for the researcher, to have the Term of Consent of the donor of the biological material (cells) being used presented in his/her project to the Ethics Research Committee System and the National Commission on Research (*Sistema Comitê de Ética em Pesquisa/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CEP/Conep*). In a commercial interaction (purchase of the cells), this document is given to the researcher (buyer) by the company (seller) selling the cells proving that the company accessed the biological material under an ethically approved Term of Consent. We suggest that by applying the

same reasoning to the Brazilian companies, we are, in fact, enforcing the principle of isonomy, a basic and highly appreciated principle of our constitution.

CONCLUSIONS

In this publication, we have shown that we have the capacity to produce technically advanced and reliable biological reagent for the scientific community in Brazil and that the regulatory framework is already established to support commercialization of such biological products under addressable ethical requirements (Term of Consent). This is an important step towards biotechnological independence and shows that Brazilian technological competence has been increasing. Results reported here are in accordance to those reported elsewhere in the literature and more data are being collected using these cells to be reported in future scientific peer review publications.

REFERENCES

1. Parasuraman S. Toxicological screening. *J Pharmacol Pharmacother*. 2011;2(2):74-9. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>
2. Wilke RA, Lin DW, Roden DM, Watkins PB, Flockhart D, Zineh I et al. Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(11):904-16. <https://doi.org/10.1038/nrd2423>
3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
4. Kolanowski TJ, Antos CL, Guan K. Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. *Int J Cardiol*. 2017;241:379-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.03.099>
5. Solomon S, Pitossi F, Rao MS. Banking on iPSC—is it doable and is it worthwhile. *Stem Cell Rev*. 2015 Feb;11(1):1-10. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9574-4> PMID:25516409
6. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013;8(1):162-75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.150>



7. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11(8):855-60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>
8. Lin Y, Chen G. Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media. CaMBRIDGE: Harvard Stem Cell Institute; 2008.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
10. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1985;24(2-3):119-24. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)
11. Ramirez MI, Yamauchi LM, de Freitas LH Jr, Uemura H, Schenkman S. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;111(1):235-40. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00309-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00309-1)
12. Bonfim-Melo A, Zanetti BF, Ferreira ÉR, Vandoninck S, Han SW, Van Lint J et al. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes trigger the protein kinase D1-cortactin-actin pathway during cell invasion. *Cell Microbiol*. 2015;17(12):1797-810. <https://doi.org/10.1111/cmi.12472>
13. Heng BC, Fussenegger M. Integration-free reprogramming of human somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) without viral vectors, recombinant DNA, and genetic modification. *Methods Mol Biol*. 2014;1151:75-94. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6_6
14. Natalwala A, Kunath T. Preparation, characterization, and banking of clinical-grade cells for neural transplantation: scale up, fingerprinting, and genomic stability of stem cell lines. *Prog Brain Res*. 2017;230:133-50. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.02.007>
15. Burridge PW, Li YF, Matsa E, Wu H, Ong SG, Sharma A et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2016;22(5):547-56. <https://doi.org/10.1038/nm.4087>
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 36, de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. Diário Oficial União. 27 ago 2015.

Acknowledgements

This work has been funded by Fapesp under the grant PIPE fase II # 2015/50224-8.

Conflict of Interest

Authors have no potential conflict of interest to declare, related to this study's political or financial peers and institutions.



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.

Advanced Therapy Medicinal Products in type I diabetes mellitus: technological and regulatory challenges

Produtos Medicinais de Terapia Avançada no diabetes mellitus tipo I: desafios tecnológicos e regulatórios

ABSTRACT

Camila Leal-Lopes^{I,II,**}

Marluce da Cunha Mantovani^{I,III,**}

Mari Cleide Sogayar^{I,II,III,*}

Introduction: Type 1 Diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disorder which arises from the destruction of insulin-producing pancreatic β -cells. Currently, Brazil's advanced therapy medicinal products (ATMP), developed for clinical research and therapeutic purposes, take place in the so-called Cellular Technology Centers (CTC), according to the Resolution n^o. 9/2011 of the Collegiate Board of Directors (RDC), enacted by the National Health Surveillance Agency (Anvisa). **Objective:** This study was conducted with the main objective of describing and discussing the development of ATMP for T1DM treatment. **Method:** A qualitative research, narrative review and critical discussion of the literature were undertaken. **Results:** ATMP promote new therapeutic approaches for Diabetes, holding great potential to restore the patients' endogenous insulin secretion, improving their life quality, overcoming the chronic complications of Diabetes and reducing the socioeconomic burden. Nowadays, ATMP in T1DM comprise: a) cell therapy; b) gene therapy products; c) tissue engineering and d) ATMP associated to biopharmaceutical products. **Conclusions:** Further research should contribute to stimulate public and private organizations to effectively act towards reducing the impact of Diabetes on individuals and the society as a whole. It is essential that Brazilian legislation closely follows the biotechnological developments, supporting the scientific progress and benefiting T1DM patients with modern and cutting-edge therapies.

KEYWORDS: Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP); Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM); Pancreatic Islet Transplantation and Encapsulation; Regulatory Legislation for Cell and Gene Therapy; Biopharmaceuticals

RESUMO

Introdução: O diabetes mellitus do tipo 1 (T1DM) é uma desordem autoimune que culmina na destruição das células β -pancreáticas produtoras de insulina. Atualmente, Produtos Medicinais de Terapia Avançada (ATMP) são desenvolvidos no Brasil, para fins de pesquisa clínica e terapia celular, pelos chamados Centros de Tecnologia Celular (CTC), de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada n^o 9/2011, emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Objetivos:** Esse estudo foi conduzido com o objetivo principal de descrever e discutir o desenvolvimento de produtos medicinais em terapia avançada (ATMP) para o tratamento de T1DM. **Método:** Esse estudo foi realizado através de pesquisa qualitativa, revisão narrativa e discussão crítica. **Resultados:** Os ATMP promovem abordagens terapêuticas para o diabetes demonstrando grande potencial para restaurar a secreção endógena de insulina dos pacientes, aumentando sua qualidade de vida, superando as complicações crônicas do Diabetes e reduzindo o impacto socioeconômico desta doença. Atualmente, os ATMP para T1DM compreendem: a) terapia celular; b) terapia gênica; c) engenharia tecidual e d) ATMP associados a produtos biofarmacêuticos. **Conclusões:** Pesquisas adicionais deverão contribuir para mobilizar governos e organizações para ações que promovam, de forma eficiente, a redução do impacto do diabetes nos indivíduos e na sociedade. Para isso, é essencial que a legislação brasileira acompanhe de perto os desenvolvimentos biotecnológicos, dando suporte para o progresso científico e beneficiando pacientes de T1DM com terapias modernas.

PALAVRAS CHAVE: Produtos Medicinais de Terapia Avançada; Diabetes Mellitus do Tipo 1; Transplante e Encapsulamento de Ilhotas Pancreáticas; Legislação Regulatória de Terapias Celulares e Genéticas; Biofármacos.

^I Cell and Molecular Therapy Center (Nucel), School of Medicine, Internal Medicine Department, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^{II} Chemistry Institute, Biochemistry Department, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^{III} School of Medicine, Internal Medicine Department, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

** These authors contributed equally to this article.

* E-mail: mcsoga@iq.usp.br



INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) belongs to a class of metabolic disorders characterized by impairment of the insulin regulatory activity, due to a combined deficiency in hormone synthesis, secretion and/or activity itself. According to the International Diabetes Federation, 415 million adults were estimated to have Diabetes worldwide in 2015, of which 318 million adults display impaired glucose tolerance¹. Brazil has the fourth highest DM incidence and the National Health Surveyor (*Pesquisa Nacional de Saúde - PNS*) estimated that, in 2013, 6.2% of the Brazilian population, aged over 18 years, were diabetic². In 2015, DM caused 5.0 million deaths, costing between 673 and 1,197 billion dollars in healthcare spending¹. It is estimated that by 2040 there will be 642 million people living with the disease, with a 19% increase in healthcare spending¹. Tackling this global epidemic is a monumental task, which requires further knowledge about the disease, in addition to the development of more effective therapeutic strategies.

Type 1 Diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disorder, which arises from destruction of insulin-producing pancreatic β -cells, present in the islets of Langerhans, a cluster of hormones-producing cells, which constitutes the endocrine pancreas. β -cell destruction results in severe complications associated with episodes of hyperglycemia, hypoglycemic unawareness, and ketoacidosis³. The chronic health complications associated with T1DM, include retinopathy, nephropathy, neuropathy, as well as cerebrovascular and cardiovascular diseases⁴, with many of these long-term complications being associated with high mortality⁵. Furthermore, this condition affects T1DM patients' quality of life and greatly increases the burden on healthcare costs.

The current therapy for T1DM is focused on maintaining a balanced diet along with lifelong insulin administration⁶. However, although a tight glucose control through insulin therapy can delay the long-term complications for numerous patients with T1DM, this treatment often renders many of the patients prone to severe hypoglycemic episodes, and thus far it has not yet been possible to adequately mimic the endogenous insulin secretion levels⁷.

Pancreas transplantation, the only clinically approved therapeutic approach for T1DM, performed almost worldwide, is able to establish prolonged normoglycemia by restoring endogenous insulin secretion in response to appropriate stimuli⁸. However, it is noteworthy that this prolonged surgical procedure exposes T1DM patients to a high risk and, in addition, patients are doomed to lifelong immunosuppression. For these reasons, this procedure is most commonly applied in combination with kidney transplantation or in diabetic patients with chronic kidney failure due to nephropathy. At a lower frequency, isolated pancreas transplantation is performed in patients with very unstable (brittle) Diabetes presenting severe episodes of asymptomatic hypoglycemia. In these patients, the risk of death from DM and poor quality of life justify the risk of pancreas transplantation and chronic immunosuppression. Therefore, given the current epidemiological proportions of T1DM and the associated socio-economic cost, the scientific community has been seeking for technically and

economically feasible therapeutic alternatives to reestablish endogenous glycemic control for the majority of T1DM patients.

Advanced therapy medicinal products (ATMP) constitute a new category of products, including genetic and cell therapy, as well as tissue engineering, all of which may be associated with biopharmaceutical products. The products are based on biomedical research progress and on the use of new and sophisticated technologies, aiming to establish patient-specific designed therapeutic interventions and effective biomarkers to predict and monitor their clinical response. ATMP development promotes new therapeutic approaches for many diseases, including cancer, Diabetes, neurodegenerative and cardiovascular, among others⁹. For Diabetes, the development of ATMP holds great potential to restore the patients' endogenous insulin secretion, increasing their quality of life, overcoming the chronic complications of Diabetes and reducing the socioeconomic burden.

In Brazil, no specific regulation regarding clinical research or therapy with ATMP is yet available; therefore, no legislation establishes the requirements to ensure product efficiency and safety. However, on September 9th, 2016, the National Health Surveillance Agency (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa*), through Ordinance n^o. 1731, established the Technical Chamber for Advanced Therapies (CAT), a permanent collegiate, technically linked to Anvisa's Blood, Tissues, Cells and Organs Management (GSTCO), with the purpose of advising Anvisa's Board of Directors (Dicol) on the regulation, evaluation, registration and post-registration procedures for ATMP, mainly to guide their production, quality control, efficacy and safety, including clinical trials¹⁰. Gathering of knowledge and deliberation about several aspects of cell therapy, considering the scientific, ethical and legal aspects, as well as intellectual property commercialization and the results already obtained from clinical research, should support the scientific community to establish new regulations to ensure safe and efficient production and use of ATMP. This article aims to discuss the *status* of ATMP in T1DM treatment in the context of the Brazilian legislation.

METHOD

This study was performed through qualitative research¹¹. A traditional literature review (or literature narrative) is presented, aiming to describe and discuss the development of ATMP for T1DM treatment. The subject was not restricted and the search tools were not pre-established, allowing the protocol to be flexible¹². The literature was surveyed for references related to the subject, using the following databases: Scientific Electronic Library Online (SciELO), National Center for Biotechnology Information (NCBI/PubMed) and the National Virtual Library (*Biblioteca Virtual em Saúde - Bireme*). Specific Brazilian legislation was also surveyed, using the Federal Government Legislation Portal and the Anvisa website. In addition, online database systems, divulgation articles published in electronic journals and biotechnological companies' websites were also referenced.



RESULTS AND DISCUSSION

ATMP in Brazil

Currently, Brazil's ATMP are developed for clinical research and therapeutic purposes at the so-called Cell Technology Centers (*Centros de Tecnologia Celular - CTC*), according to the Resolution of the Collegiate Board of Directors (*Resolução da Diretoria Colegiada - RDC*) n°. 9, enacted by Anvisa¹³. To fulfill their purposes, the CTC must follow minimum technical and sanitary requirements for sampling, processing, packaging, storage, quality control evaluation, disposal, approval and transportation of human cells and their derivatives, in order to ensure quality and safety of the therapeutic products.

ATMP for T1DM treatment

ATMP constitute a new category of products, comprising gene therapy and cell therapy, as well as tissue engineering, all of which may be associated with biopharmaceutical products. For T1DM treatment, several ATMP are under development (Table).

Cell therapy products

Regarding the cell type, cell source and the degree of manipulation complexity, cell therapy products can be very highly variable. The cells may be adult, fully differentiated, self-renewing stem cells (SC) or progenitor cells, manipulated or expanded *in vitro*, in order to exert a specific physiological function. These cells may be of autologous, allogeneic or xenogeneic origin. In addition, cells may also be genetically modified. Another possibility is to use either cells alone or associated with biomolecules and chemicals, or combined with structural materials classified as medical devices⁹.

Currently, pancreatic islet transplantation is considered as one of the most promising cell therapy approaches to achieve insulin independence in T1DM patients. Pancreatic islet isolation and purification requires a 5-7 h multi-step process to extract the islet fraction, which represents hundreds of thousands of clustered cells (Langerhans's islets), which comprise only 1%-2% of the pancreas volume¹⁴. This procedure involves mechanical and

enzymatic digestion to isolate pancreatic islet cells from the pancreatic parenchyma of a deceased organ donor. Following isolation and purification, the pancreatic islets are cultured *in vitro* prior to their transplantation into a T1DM recipient patient¹⁵.

Detailed standard operating procedures (SOP) and master production batch records for manufacturing of purified human pancreatic islet lots suitable for clinical transplantation are key to ensure that a viable mass of insulin-producing cells can be safely infused into the recipients¹⁴. These SOP detail each procedural step, from donor procurement/selection and islets isolation and purification to pre-transplantation *in vitro* culture, quality controls and product release criteria for transplantation, such as: assessment of identity, viability, potency and sterility of the final islet product¹⁴. Using a minimally invasive surgery, the pancreatic islets are then infused into the liver through the portal vein system of the T1DM patient. The implanted islets become lodged within the liver capillaries, engrafting and functioning within the liver tissue. Patient recovery is rapid, with a very low risk of infection and minimal morbidity. Actually, pancreatic islet transplantation is considered to be among the safest of all transplantation procedures, when performed in dedicated centers¹⁶.

Islet transplanted T1DM patients present marked improvement in both short-term and long-term outcomes, and insulin independence after initial or subsequent transplantation was achieved in up to 80% of patients one year post-transplantation^{15,17}. Approximately 50% of the patients remained insulin independent at five years after receiving the transplant. Islet transplantation is already approved and reimbursable by insurance companies or covered by National Health Systems in several countries, including Canada, Australia, the UK, Switzerland, Italy, France and other parts of Europe, in a total of 40 countries¹⁴. Over 1,500 procedures have been performed worldwide, including 864 allogeneic transplants and 480 autologous transplants, in cases of total pancreatectomy of non-diabetic patients¹⁷.

An assessment of the Clinical Trials website (www.clinicaltrials.gov), in September 2017, using the keyword "islet transplantation", identified 155 studies. Among these, eight were withdrawn, two were suspended, three are not yet recruiting patients, 16 are active, but not recruiting patients, 35 are

Table. Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) currently under development and their potential use in type 1 diabetes.

Classification	ATMP
Cell therapy products	<ul style="list-style-type: none"> - Human pancreatic islets - Microencapsulated human pancreatic islets - Microencapsulated porcine pancreatic islets - Pancreatic progenitor cells from hESCs/hiPSCs - B-like cells differentiated from hESCs/hiPSCs
Gene Therapy Products	<ul style="list-style-type: none"> - Blockage of B-cells autoimmune destruction - Reprogrammed non-B cells into surrogate B cells - Replacement of B-cell function (insulin gene therapy)
Tissue engineering	<ul style="list-style-type: none"> - Bioartificial Pancreas
Biopharmaceutical products associated to ATMPs	<ul style="list-style-type: none"> - Prolactin - VEGF - PDGF <p>Diverse objectives: <i>in vitro</i> cultures of pancreatic islets, reconstitution of decellularized pancreatic matrixes, hESC/hiPSC differentiation etc.</p>

hESCs: human embryonic stem cells; hiPSCs: human induced pluripotent stem cells; VEGF: vascular endothelial growth factor; PDGF: platelet-derived growth factor.



currently recruiting patients, four are enrolling patients, 57 were clinically completed, 11 are finished and 19 have unknown status. One is at early phase I, 60 are in phase I, 74 are in phase II, 15 studies in phase III, and three studies in phase IV. These studies include investigations of different immunosuppressive drugs, anti-inflammatory therapy, sites of implantation, islet encapsulation and device development, autologous islet transplantation in cases of total pancreatectomy, effect of dietary interventions, cord blood infusion, hematopoietic stem cell transplantation and mesenchymal stem cell transplantation. Recently, the Clinical Islet Transplantation Consortium completed the first multi-center phase III study to evaluate the efficacy and safety of clinical grade islets for treatment of T1DM complicated by severe hypoglycemia and hypoglycemic unawareness. Islet transplantation was shown to be safe and to result in elimination of severe hypoglycemia and restoration of normal or near-normal glycemic control in 87.5% of participants at the one year follow-up¹⁸.

In Brazil, unfortunately, pancreatic islet transplantation is still considered as an experimental procedure. In addition, access to this procedure is limited by unsustainable costs, based only on limited academic research funding. The first Brazilian pancreatic islet transplantation was performed in 2002 by our group, the Cell and Molecular Therapy Center (Nucel), São Paulo University, the procedure being performed in a T1DM patient with recurrent and severe hypoglycemia episodes and metabolic instability¹⁹. The efforts of our multidisciplinary group have made the procedure possible. The cell biology team, responsible for islet isolation, purification and quality control, maintains close contact with a team of specialized surgeons and clinicians²⁰. By the time this article was submitted, eleven islet infusions had been performed in five patients (unpublished data). Currently, two Brazilian groups are interested in islet isolation research, namely, our own group and that associated with PUC-Paraná and the Pro-Kidney Foundation, who reported an islet transplantation in 2005²¹.

Despite the success of islet transplantation, widespread utilization of the procedure remains hampered by the shortage of good quality donor pancreas²². This limited supply of organs makes it very challenging to reach a target islet cell mass of approximately 10,000 islet equivalents (IEQ) per kilogram of recipient body weight from one organ alone^{15,23,24}. Moreover, up to three individual islet infusions from multiple allograft donors are often necessary to reach a sufficient islet mass to achieve normoglycemia²⁵. Additionally, following islet cell transplantation, the patient is placed on an immunosuppressive regimen in order to prevent islet cells rejection. Potential islet transplant recipients are selected for this type of therapy only if they are deemed capable of tolerating long-term immunosuppressive medication²⁶. The side effects of immunosuppressant drugs are widely known, including mouth ulceration, nausea, anemia, leukopenia and vomiting, as well as certain cancers²⁴.

Islet encapsulation involves coating cells with an artificial membrane so as to preserve their physical and functional integrity. The membrane functions as a barrier with selective permeability, allowing nutrients to enter the cells and metabolic products to be discarded, while preventing the influx of components of

the immune system (cells and cytokines)²⁷. The material should be biocompatible and mechanically stable, while providing a suitable environment for cell survival, growth and differentiation. In recent years, the field of islet microencapsulation has demonstrated the potential to overcome the need for immunosuppression and to expand the donor pool so as to include other cell sources²⁸.

In addition to acting as a barrier to the immune system, capsules can also act as a therapeutic factor to increase cell viability. Pancreatic islets isolation is still associated with loss of cell viability, which is due to disruption of the extracellular matrix (ECM), leading to β -cells apoptosis²⁹. Our group has developed a novel biomaterial, called Bioprotect[®]^{30,31} to tackle this issue. Bioprotect, based on alginate, chondroitin sulfate and laminin, has been used for microencapsulation of rat islets which were implanted into mice rendered diabetic, causing complete reversion of T1DM over a long period of time^{30,31}. Addition of laminin to the microcapsules composition leads to modulation of gene expression and functionality of microencapsulated pancreatic islets, providing greater cell viability and normoglycemia in diabetic animals, for extended periods of time. Translation of this technology into the clinical practice will require encapsulation compounds in adequate purity and observation of GMP standards in order to obtain the adequate therapeutic product for humans.

Numerous clinical trials involving microencapsulation as a treatment for T1DM have been performed in the past few decades³². The safety of encapsulated islet allotransplantation was evaluated in a procedure performed in a 38 year T1DM patient³³. Cadaveric human islets were encapsulated in alginate microcapsules and infused intraperitoneally. The patient was already on anti-rejection medications due to a renal transplant, but was able to discontinue all exogenous insulin for nine months. Following progress in capsule design has led to two additional encapsulated human islet transplantations to T1DM recipients^{34,35}. Also, studies carried out with T1DM patients transplanted with microencapsulated xenograft islets provided a significant reduction in exogenous insulin requirements for a certain period, but no complete insulin independence was achieved^{36,37}. Transplantation of encapsulated human islets has been clinically evaluated and is generally recognized as safe. Since T1DM is an autoimmune disease, the capsules may still be required regardless of the cell source for protection of the graft from destruction by the recipient's own immune system.

As previously stated, two major challenges preventing islet cell transplantation from becoming available to a larger cohort of patients with T1DM are: the requirement for immunosuppressive medication following transplantation, which could be overcome with islet encapsulation, and the shortage of islet cells donors. Since islet transplantation is based on cell isolation and purification from pancreas of cadaveric donors, which are frequently in great shortage and demand, it is essential to develop approaches to increase the supply of insulin-producing cells for β -cell replacement therapy, such as stem-cell-derived β -cells and xenogeneic sources of pancreatic endocrine cells. Islet microencapsulation allows for safe and efficacious use of xenogeneic material for



T1DM treatment. A constantly growing number of clinical studies point to the use of microencapsulated porcine pancreatic islets. There are numerous advantages in using porcine islets, which include: homology between porcine and human insulin, ample availability of large quantities of islets from porcine donors, and reduced ethical issues in their production^{37,38,39,40}.

Notably, in 2007, a large clinical study using commercial micro-encapsulated pig islets (also called “Diabecell”) was performed by the Living Cell Technologies (LCT) Company⁴¹. Six of eight patients demonstrated a reduced exogenous insulin requirement and reduced glycated hemoglobin (HbA1c) levels, with two of the patients demonstrating insulin independence for up to 32 weeks⁴¹. Further studies (phase II clinical study, performed in New Zealand and ongoing phase II clinical trial in Argentina^{42,43}) showed greater benefit of using encapsulated porcine islets, however, no clinical trials involving porcine tissue have resulted in excellent metabolic control to date³². These initial studies have demonstrated the potential use of this technology as a safe and effective treatment option for T1DM, but also raised concerns about the potential risk of zoonosis. Islet xenografts will demand rigorous regulation and should be obtained from specific pathogen-free (SPF) pig breeds.

Another possible solution for the organ donor shortage is generation of β -cells or islet tissue from pluripotent stem cells, such as human embryonic stem cells (hESCs)⁴⁴ and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs)^{45,46}. Directed differentiation of pancreatic lineage cells from hESCs/iPSCs has been vigorously studied as ATMP for T1DM therapy⁴⁷. Substantial progress in this research field was made in recent years. In the United States of America (USA), phase I/II clinical trials for T1DM patients have already been started with the use of hESC-derived pancreatic progenitor cells⁴⁷.

In order to induce differentiation of hESCs/iPSCs into the pancreatic lineage cells, the normal developmental stages of the pancreas are mimicked and reproduced *in vitro* using overexpression of key transcription factors involved in pancreas development. The pancreatic developmental stages are induced using a combination of growth factors and chemical compounds to activate or inhibit key signal pathways. Until recently, most investigators have generated pancreatic β -like cells that produce and secrete insulin in response to stimuli, however, these cells do not secrete suitable amounts of insulin in response to changes in blood glucose levels and usually co-express other hormones, such as glucagon and somatostatin, rendering them inferior to adult β -cells^{48,49}.

More recently, two groups have succeeded in generating functionally mature β -like cells from hESCs/iPSCs, however, details on the maturation mechanism remain to be elucidated^{50,51}. Some issues, such as the stability and high cost of the differentiation process, still remain to be improved. In 2014, ViaCyte Inc. announced a clinical trial for T1DM patients’ treatment using an immunoprotective device which carried pancreatic progenitor cells differentiated from hESCs⁵². The immature β -cells are designed to further differentiate *in vivo* into mature pancreatic

β -cells, which synthesize and secrete insulin and other hormones. This trial represents an initial and important step for the development of a stem cell-based ATMP therapy for T1DM.

The use of hiPSCs has a number of advantages over hESCs, such as the possibility of autologous cell transplantation and fewer ethical problems; therefore, hiPSC-based therapy is expected to lead the β -cell replacement therapy in the future. However, so far, no clinical trials have been carried out with transplantation of hiPSC-derived pancreatic cells⁴⁷. Achieving economically and technologically viable SC therapy still constitutes a great challenge, since this ATMP requires strict rules for handling and production, as well as the use of compounds and factors produced under appropriate Good Manufacturing Practice (GMP) conditions.

Gene Therapy products

Transfer of genetic sequences (DNA, RNA) to cells using different transducing agents, including plasmids, virus or bacterial vectors, is called Gene Therapy. The genetic sequences are designed to modify, control, inhibit, or overexpress a specific target sequence. The main objective is to induce genetic modification of somatic cells *in vivo*⁵¹. Any modification of germ cells is strictly prohibited by Anvisa. Somatic cells can also be modified *ex vivo* or *in vitro*^{54,55}. The goal of future treatments for T1DM is to restore dynamic control over blood glucose levels without requiring daily insulin injections, surgical procedures, or lifelong immunosuppressive regimens. Additionally, future therapies must be affordable for all patients. Gene therapy has emerged as a promising alternative for T1DM treatment, which could meet all of the aforementioned criteria. The *in vivo* delivery of therapeutic genes can improve the clinical outcome of diabetic individuals by preventing the autoimmune destruction of β -cells prior to the onset of the disease, reprogramming non- β cells into replacement β -cells, or simply replacing the function of lost β -cells.

Two main strategies are envisaged to prevent the autoimmune destruction of β -cells through gene therapy, namely: edition of the immune system so as to prevent recognition of β -cell antigens as foreign and modification of residual β -cells to withstand the autoimmune attack. However, these approaches are limited because they rely on early detection of Diabetes, while more than 80% of the patient’s β -cells have already been destroyed by the time they become symptomatic. In addition, T1DM is a multifactorial disease, rendering it difficult to predict whether an individual will ever become diabetic, causing early intervention risky^{56,57}.

Gene therapy may be used to reprogram non- β cells to generate replacement β -cells, which are as similar as possible to native β -cells. Many cell types have been targeted for this purpose, including pancreatic exocrine cells^{58,59}, keratinocytes⁶⁰ and hepatocytes^{61,62,63}, the latter being the most common target due to their close developmental relationship with β -cells. To obtain reprogrammed cells, the expression of transcription factors is induced, mainly the pancreatic and duodenal homeobox



gene 1 (PDX1) transcription factor, which regulates pancreatic development during embryogenesis and controls β -cell function in adults⁶¹. The β -cells produced from reprogramming are able to ameliorate hyperglycemia in diabetic models, however, the long-term efficacy of this strategy requires the absence of recurring autoimmunity and might require either lifelong immunosuppression or selective immunomodulation to prolong the survival of the newly generated β -cells⁵⁶.

The strategy known as insulin gene therapy aims to replace the key functions of β -cells without substantially altering the phenotype of the host cell, by expressing insulin alone in non- β cells without the risk of autoimmune destruction⁵⁶. An appropriate insulin-sensing target organ and an effective gene delivery method, both of which have to be safe and effective, must be selected. Both viral and non-viral vector-based gene delivery methods have been used for insulin gene therapy applications, each of which showing successful amelioration of Diabetes-associated hyperglycemia in small animal models^{64,65,66}. Viral vectors have been more commonly used due to efficient delivery to target cells and chromosomal integration. Adenoviruses^{65,67,68}, adeno-associated viruses^{69,70,71}, oncoretroviruses^{72,73} and lentiviruses^{74,75,76} all have been used to deliver insulin to hepatocytes. Lentiviral vectors can transduce both dividing and non-dividing cells, are non-immunogenic, and can induce long-term expression of insulin, being thus considered the optimal gene delivery vehicle for long-term correction of T1DM^{74,75,76}. Many advances in hepatic insulin gene therapy have been made, yielding promising results in mouse and rat models of T1DM, however, these models do not always accurately replicate the human disease and long-term safety of lentiviral vector-mediated insulin gene therapy still needs to be evaluated. Safety mechanisms, such as self-inactivating vectors and suicide genes, are alternative options to improve vectors safety.

Tissue engineering

Human tissue engineering products combine several aspects of cellular and molecular biology, medicine, materials science and engineering. The aim is to regenerate, repair or replace unhealthy or absent tissues and organs, acting by replacing the missing tissue, restoring tissue function or replacing unhealthy tissues. These products are characterized by a three-dimensional structural complexity. Development of an artificial pancreas, through an appropriate combination of cells and biologically active molecules in a scaffold, constitutes an attractive alternative therapy for T1DM.

Each organ or tissue is composed of a unique ECM, with particular microstructures and biomechanical properties, which is able to support the resident cells⁷⁷. This matrix influences cell proliferation and chemotaxis, in addition to directing cell differentiation and inducing tissue remodeling^{78,79,80,81,82,83}. The three-dimensional ultrastructure, surface topology and extracellular matrix composition are likely to contribute to these effects⁸⁴. Matrices derived from fully decellularized organs constitute an attractive

scaffold to be repopulated with different kinds of cells, aiming at the generation of an engineered new pancreas^{85,86,87}.

Some studies have showed increased functionality of pancreatic islets when they were cultured in decellularized matrices derived from submucosa of the small intestine⁸⁸ and pancreas^{85,89}. For mouse pancreas, it is possible to generate a 3D scaffold from the whole organ by the perfusion-decellularization technique and to reconstitute the scaffold with acinar and endocrine insulinoma cell lines, producing an engineered organ⁸⁶. For human pancreas, a study was able to generate a 3D scaffold from the entire acellular organ, by the perfusion-decellularization technique with detergents⁸⁷. The scaffold was used in 2D cultures of human pancreatic islets and in 3D assays in a bioreactor, demonstrating scaffold cytocompatibility⁸⁷. Despite notable progress, significant challenges are still posed in the field. Thus, it is still necessary to scale-up the techniques for human-sized organs, to find clinically relevant cell types for recellularization, and to completely rebuild the vasculature and parenchyma of the scaffolds in order to support long-term function after transplantation⁹⁰.

Biopharmaceutical products associated to ATMP

Biopharmaceuticals or biological medical products are those obtained from a biological source or process. The active substance is obtained through the industrial use of microorganisms or genetically modified cells. These biotechnological processes may be carried out both *in vitro* and *in vivo*, allowing for production of complex proteins with improved biological activity, longer half-lives and fewer side effects. Biological drugs for direct treatment of T1DM patients have been extensively pursued. However, biopharmaceutical products can also be used in association with ATMP to improve their viability, functionality and quality, as to enhance and expand *in vitro* cultures of pancreatic islets, improve cellular reconstitution of decellularized pancreatic matrixes, differentiate hESC/hiPSC into insulin producing cells and as active compounds of immunoprotective microcapsules.

The *in vitro* expansion of endocrine pancreatic cultures is an alternative strategy to obtain a greater β -cells mass to be transplanted. It is well known that β -cells rarely proliferate and the proliferation rate is very low, except during the gestational and the neonatal periods^{91,92}. Biopharmaceutical molecules involved with cell cycle regulation, such as cyclins and hormones, have been evaluated as means to stimulate β -cell proliferation^{93,94}. Our group has shown that Prolactin, a hormone produced during pregnancy, not only has a mitogenic activity in β -cells, but, also, induces insulin production and secretion⁹⁴. β -cell proliferation can also be induced in bioreactors⁹⁵ associated with proliferation-inducing molecules.

Regarding the reconstitution of decellularized pancreatic matrixes, biological drugs can create an adequate ambient for matrix repopulation. Growth factors added to scaffolds and to biomaterials, such as the immunoprotective microcapsules, can increase pancreatic islets vascularization, cell viability, function and glucose responsiveness⁹⁶. Pancreatic islets are extremely vascularized⁹⁷,



therefore, it is crucial to reestablish the vasculature network before attempting to recellularize pancreatic matrices. Formation of a vascular network is highly dependent on growth factors, such as the vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), which is also able to prevent B-cell apoptosis^{96,98,99,100}, and platelet-derived growth factor subunit BB (PDGF-BB). Biopharmaceutical products may also be used to induce hESC/hiPSC differentiation into insulin producing cells, allowing the use of a chemically defined culture medium and maintenance of GMP specifications.

Relevant Brazilian policies in cellular technology

In Brazil, no specific regulation regarding clinical research or therapy with ATMP is yet available; therefore, no legislation establishes which procedures and assays are required to ensure product efficiency and safety. However, any clinical research protocol must be previously analyzed and approved by the Ethics Research Committee System and the National Commission on Research (*Sistema Comitê de Ética em Pesquisa/ Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CEP/Conep*), as a way to protect the population¹⁰¹. In addition, ANVISA enacted RDC n°. 09 in 2011, to establish the minimum technical and sanitary requirements for CTC¹³, which are the research centers in charge of ATMP development for clinical use. Anvisa is also deliberating, in a broad and democratic manner, about several aspects of cell therapy, considering the scientific, ethical and legal aspects, as well as intellectual property commercialization. From these discussions, manuals of Good Practices in Cell Therapy have been elaborated, combined with new resolutions involving ATMP^{13,102,103}. Development of new regulations, gathering of knowledge on relevant Brazilian policies and the results already obtained from clinical research, support the scientific community in the establishment of new regulations to ensure safe and efficient production and use of ATMP.

Article 199 from the 1988 Brazilian Federal Constitution, prohibits commercialization of organs, tissues and human substances for the purpose of transplantation, research and treatment¹⁰⁴. The first Brazilian law (n°. 4,280) regulating organs transplantation, was created in November 6th, 1963, specifying the guidelines for removal of organs or tissues from deceased individuals¹⁰⁵. This law was subsequently revoked by Law n°. 5,479 (August 10th, 1968), which regulates organ and tissue donation and transplantation, including living donors, for therapeutic and scientific purposes¹⁰⁶. In November 18th 1992, Law n°. 8,489, also called the Brazilian Law of Transplants, was enacted, overruling and updating the previous law¹⁰⁷. Subsequently, a new law (n°. 9,434) was enacted (February 4th, 1997)¹⁰⁸, which was also overruled by the most recent one, Law n°. 10,211 (March 23rd 2001)¹⁰⁹.

In May 28th 1992, the Federal Medical Council (*Conselho Federal de Medicina - CFM*) issued Resolution n°. 1,358, forbidding human embryos destruction, but allowing the altruistic and anonymous embryos donation for assisted reproduction purposes¹¹⁰. On February 4th 1997, Law n°. 9,434 overruled this CFM resolution¹¹¹. After 18 years, a new CFM Resolution (n°. 1,957) was enacted (December 15th, 2010), updating regulations regarding assisted reproduction procedures¹¹².

In 1995, Law n°. 8,974, also known as Biosafety or Genetic Engineering Law, was enacted, regulating the use of transgenic, genetic and genomic therapies and forbidding “production, storage or manipulation of human embryos intended to serve as biological material”. The National Technical Biosafety Commission (*Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio*) was also created to inspect ATMP-related activities¹¹³.

The Industrial Property Law, also known as Industrial Property Code or Patent Law, n°. 9,279 was enacted on May 14th, 1996¹¹⁴, regulating SC-related inventions and considering as patentable any invention that meets the novelty, inventive and industrial application requirements.

Also, in October 10th, 1996, the National Health Council (*Conselho Nacional de Saúde, CNS*), from the Ministry of Health (*Ministério da Saúde, MS*), created Resolution n°. 196, dictating guidelines and regulatory standards for research involving human beings¹¹⁵. A mandatory research tool was established, the Informed Consent Terms, to be completed and signed by patients or family members¹⁰¹.

The Copyright Law n°. 9,610 was enacted in February 19th, 1998¹¹⁶, protecting intellectual work as creations of the spirit, expressed by any means or support, tangible or intangible, known or future. In sciences, the copyright law does not cover scientific or technical content, meaning that the industrial or commercial use of the ideas is not subject to copyright protection.

At the end of the 1990s, Regulatory Agencies were created in Brazil. Anvisa was created by Law n°. 9,782 (January 26th, 1999)¹¹⁷, promoting consistent incorporation of standardized procedures and protocols to control health services. On February 21st, 2002, Anvisa enacted RDC n°. 50¹¹⁸, this resolution establishes technical standards on physical infrastructure, including planning, preparation and evaluation of physical projects for health care establishments. On July 18th, 2003, Anvisa enacted RDC n°. 190, which establishes technical standards for the operation of umbilical and placental cord blood banks¹¹⁹. Also, on August 4th of the same year, Anvisa enacted RDC n°. 210 to establish GMP technical standards for drugs¹²⁰, this RDC served as a guide for laboratories working with the ATMP, at a time when no specific/relevant Brazilian legislation existed.

On December 2nd, 2004, Law n°. 10,973, called the Innovation Law, was enacted¹²¹, regulating the relationship between Universities, Research Institutions and Companies. This Law promotes patents on research results developed with public resources and the creation of Specialized Medical Services (SMEs) and scientific spin-off companies. The law also regulates how the profits of licensing patent-protected technologies, jointly developed by companies and Universities/researchers, should be shared.

Also in 2004, Anvisa enacted two other RDCs, namely: n°. 153 determining the technical regulation for hemotherapy procedures, including collection, processing, test, storage, transportation, quality control and human use of blood and its components, obtained from venous blood, umbilical cord, placenta and bone marrow¹²² and n°. 306, describing the technical regulation required for management of health services waste¹²³.



In January 13th, 2005, the CNS enacted Resolution n^o. 347 to regulate storage and use of human biological material in the scope of research projects¹²⁴. In that same year, the Biosafety Law (n^o. 11,105) was enacted (March 24th, 2005), establishing safety standards and mechanisms to supervise human embryonic stem-cells related activities and, also, created the National Biosafety Council (*Conselho Nacional de Biossegurança* - CNBS), restructured CTN-Bio and the National Biosafety Policy (*Política Nacional de Biossegurança* - PNB)⁵⁴. This law has also delegated to Anvisa the establishment of rules for the collection, processing, test, storage, transport, quality control procedures for ATMP and, to the Health Ministry (MS), the regulation of cellular research and therapies¹²⁵.

On October 26th, 2005, Anvisa enacted RDC n^o. 315, regulating the technical registration, post-registration modifications and registry revalidation of finished biological products¹²⁶. This RDC was later updated by RDC n^o. 55, in 2010¹²⁷, which could be used as a guide for ATMP technical registration, regulation and association with biopharmaceutical products. Also in 2005 (November 21st), Law n^o. 11,196, the so called Good Law, was enacted¹²⁸.

On December 16th, 2010, Anvisa approved RCD n^o. 56, which reviewed the regulation regarding the collection, processing, test, storage, transport, quality control and human use of hematopoietic SC obtained from bone marrow, peripheral blood, cord blood and placental blood for the purpose of conventional transplantation of hematopoietic progenitor cells¹²⁹. This resolution was subsequently amended by RDC n^o. 19 (March 23rd 2012)¹³⁰.

In 2011, a major milestone was the publication of RDC n^o. 9, dated March 14th, by Anvisa. Minimum technical and sanitary requirements for CTC operation were established and, also, rules for collection, processing, packaging, storage, quality control evaluation, disposal and approval for release of human cells and their derivatives were published, contemplating clinical research and SC therapy¹³. Also in 2011, Anvisa published RDC n^o. 23 (May 27th), which establishes the technical regulation for operation of germinative tissue and cell biobanks and provides other regulations¹³¹. This resolution was subsequently amended by RDC n^o. 72 (March 30th, 2016)¹³².

It is important to note that, in Brazil, hematopoietic stem cells (HSC) transplants are the only routinely and clinically regulated cell therapies. These transplants, which consist of the intravenous infusion of HSCs, were initiated in 1979, but it was only in 1992 that Law n^o. 8,489 was sanctioned, mentioning, for the first time, transplantation of HSCs as a therapeutic procedure¹³³. Still, only in 2010, ANVISA reviewed this matter in RCD n^o. 56^{129,134}, which was later updated by RDC n^o. 19, in 2012¹³⁰.

The Biobanks and the Biorepositories are meant to store biological samples, usually from human source, such as: body fluids, cells, tissues, intracellular substances and DNA. Nowadays, there is a worldwide concern to establish a coordinated Biobank Network, following ethical, legal and technical principles¹³⁵. In Brazil, the National Cell Therapy Network (*Rede Nacional de Terapia Celular* - RNTC www.rntc.org.br) was created, in 2008, comprising eight CTC, located in five Brazilian States and, also, by 52 research groups selected by the National Council for Scientific

and Technological Development (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* - CNPq), supported by the Ministry of Science, Technology and Innovation (*Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação* - MCTI) and the Ministry of Health (MS-Decit). The RNTC was created to increase the integration among researchers from all over Brazil, to enable information exchange regarding scientific knowledge and technological competence in Regenerative Medicine, as well to establish a national Stem Cells Biobank¹³⁶. The MS has also enacted Decree n^o. 2,201, establishing the National Guidelines for Biorepository and Biobank of Human Biological Material for Research Purpose¹³⁷.

Major regulatory challenges

As described above, Brazilian regulations have been established over the past few years in the face of several discussions regarding laws and decrees, ethics, sanitary issues, and procedural approvals. Much has been learned from pre-existing documents from related areas, which provide information that serve as a regulatory basis to establish up-to-date guidelines to deal with ATMP and future challenges. This task is not simple, since the cellular response mechanisms are extremely complex and not always completely elucidated. Nevertheless, no specific Brazilian regulation is yet available to determine which procedures and trials should be followed with ATMP to warrant their safe and effective use in humans.

Another issue is whether the ATMP should be regulated as personalized treatments or as medicines, both of which pose obstacles. If ATMP are to be regulated as personalized procedures/treatments, they no longer have industrial attractiveness, rendering them more time-consuming and costly. On the other hand, if the ATMP become regulated as medicines, the current Federal Constitutional impediment of human organs, tissues and substances commercialization for the purpose of transplantation, research and treatment, will limit the development of new therapies, reducing the interest of pharmaceutical companies in the development of Brazilian ATMP-based technology¹²⁵.

Another important issue to be considered is the need for large-scale production of ATMP. A large-scaled, profitable, efficient and safe bioprocess involves a high cost of execution and analysis. The cost issue is an important question to be addressed, since high cost represents an obstacle to the promotion of ATMP-based therapy products, however, it is important to keep in mind that the process should be developed mainly to be consistent with the regulatory agencies requirements.

CONCLUSIONS

DM is a metabolic disorder that will affect 642 million people by 2040, 10% of which will be T1DM patients. In addition to placing a large financial burden on individuals and their families, due to the cost of insulin and other essential medicines, Diabetes also has a substantial economic impact on countries (particularly the less favored ones) and National Health Systems. The majority of countries spend between 5% and 20% of their total health expenditure on Diabetes¹. Tackling this global epidemic is a monumental task



that will require increasing knowledge about the disease and the development of more effective therapeutic strategies.

The world market for Diabetes medications generated US\$ 35.6 billion in 2012, and the revenues indicate strong growth for 2023, reaching US\$ 55.3 billion in 2017¹³⁸. The Brazilian market for diabetic drugs was valued as US\$ 0.65 billion in 2011¹³⁸. Since 2006, and the introduction of Federal Law n^o. 11347, medications and supplies needed for the control and monitoring of Diabetes, are now freely distributed by the government¹³⁹. The Brazilian Diabetes drug market revenue forecast is of US\$ 1.18 billion for 2023, with a 1% annual growth¹³⁸. These data highlight the fact that Diabetes treatment has become an industrial goal with high profits and great impact on public health and the economy. ATMP development promotes new therapeutic approaches for many diseases, including Diabetes, holding great potential to restore patients' endogenous insulin secretion, increasing the patients' life quality, overcoming the chronic complications of Diabetes and reducing the socioeconomic burden.

Islet cell transplantation is currently viewed as one of the most promising cell therapy approaches to achieve insulin independence in T1DM patients. Despite the success of islet transplantation, widespread utilization of this procedure remains limited. Only a reduced number of procedures have been performed in Brazil, a fact explained by the unsustainable costs, based only on limited academic research funding. Additionally, two major challenges prevent islet cell transplantation from becoming available to a larger cohort of T1DM patients, namely: the need for immunosuppressive medication following transplantation and the shortage of pancreatic islet tissue donor.

Since islet transplantation is based on cell isolation and purification from pancreas of cadaveric donors, which are frequently in great shortage and demand, it is essential to develop approaches to increase the supply of insulin-producing cells for β -cell replacement therapy, such as xenogeneic or SC-derived sources of pancreatic endocrine cells. Initial studies have demonstrated the potential use of xenogeneic pancreatic islet as a safe and effective treatment option for T1DM, but also raised concerns about the potential risk of zoonosis. SC therapy, despite some issues, such as the stability and cost of the differentiation, is expected to overcome the major obstacles for Regenerative Medicine for Diabetes treatment. The use of hiPSCs has advantages over hESCs, such as feasibility of autologous cell transplantation and fewer ethical issues, therefore, hiPSC-based therapy is expected to lead the replacement therapy in the future. Rendering SC therapy economically and technologically viable is a major challenge. Production of this ATMP will require strict rules of handling and production, as well as the use of compounds produced under appropriate GMP conditions.

Regarding the second obstacle for clinical pancreatic islet transplantation, the need for immunosuppressive medication following transplantation, transplantation of encapsulated human islets has been clinically evaluated and is generally recognized as safe, similarly to transplantation of encapsulated xenogeneic pancreatic islets. But, since hiPSC-based therapy holds great promise for T1DM treatment and allows autologous transplantation, it is important to emphasize that, due to the T1DM autoimmune mechanism, encapsulation may still be required regardless of the cell source, to protect the graft from an autoimmune attack.

A very promising future perspective is to reconstitute the whole pancreas, however, despite notable progress, significant challenges still lie ahead in the field. It is necessary to scale-up the techniques for human-sized organs, to find clinically relevant cell types for recellularization, and to completely rebuild the vasculature, following GMP requirements. In this process, biopharmaceutical products will be essential to improve cellular reconstitution of decellularized pancreatic matrixes. The field of biopharmaceutical development holds great promise to drive many other ATMP protocols, by providing the necessary molecules to enhance and expand *in vitro* cultures of pancreatic islets, to induce hESC/hiPSC differentiation into insulin producing cells, to improve immunoprotective microcapsules, allowing the use of defined culture media and maintenance of GMP specifications, while also acting, through an appropriate combination of cells and biologically active molecules, in the development of an artificial pancreas.

Still, the main goal for future T1DM treatments will be to restore dynamic control over blood glucose levels, without requiring daily insulin injections, surgical procedures, or lifelong immunosuppressive regimens. More important, future therapies must be affordable for all patients. In this sense, gene therapy is a promising alternative for T1DM treatment and one that could meet all of the aforementioned criteria. However, it will require much developmental advancement to ensure its safety and efficacy.

Further research should contribute to stimulate public and private organizations to effectively act towards reducing the impact of Diabetes on individuals and the society as a whole. Several regulatory challenges still remain to be addressed and efforts should be directed to optimize the regulatory processes. Brazilian regulations should contemplate the needs of the scientific community and of patients, preparing for good manufacture practices, attracting financial resources, promoting the development of new ATMP-based technologies and increasing the patient's access to these products. It is essential that the Brazilian legislation promote biotechnological development, supporting the scientific progress and benefiting T1DM patients with modern and cutting-edge therapies.

REFERENCES

1. International Diabetes Federation. Diabetes atlas. Brussels: International Diabetes Federation; 2015[access 2015 Feb 17]. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>
2. Pesquisa Nacional de Saúde. 2013[access 2017 Sep 12]. Available from: <https://www.pns.icict.fiocruz.br/index.php?pag=resultados>



3. Umpierrez GE, Murphy MB, Kitabchi AE. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar syndrome. *Diabetes Spectr.* 2002;15(1):28-36. <https://doi.org/10.2337/diaspect.15.1.28>
4. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther.* 2008;88(11):1322-35. <https://doi.org/10.2522/ptj.20080008>
5. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia.* 2003;46(6):760-5. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1116-6>
6. Yeh HC, Brown TT, Maruthur N, Ranasinghe P, Berger Z, Suh YD et al. Comparative effectiveness and safety of methods of insulin delivery and glucose monitoring for diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2012;157(5):336-47. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-5-201209040-00508>
7. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. *J Pediatr.* 1994;125(2):177-88. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(94\)70190-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(94)70190-3)
8. Frank A, Deng S, Huang X, Velidedeoglu E, Bae YS, Liu C et al. Transplantation for type I diabetes: comparison of vascularized whole-organ pancreas with isolated pancreatic islets. *Ann Surg.* 2004 240(4):631-40.
9. Belardelli F, Rizza P, Moretti F, Carella C, Galli MC, Migliaccio G. Translational research on advanced therapies. *Ann Ist Super Sanita.* 2011;47(1):72-8. https://doi.org/10.4415/ANN_11_01_15.
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Portaria Nº 1.731, de 9 de setembro de 2016. Institui a Câmara Técnica de Terapias Avançadas (CAT) da Anvisa. *Diário Oficial União.* 2016 Sep 9.
11. Serapioni M. Métodos qualitativos e quantitativos na pesquisa social em saúde: algumas estratégias para a integração. *Ciênc Amp Saúde Coletiva.* 2000;5(1):187-92. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232000000100016>
12. Rother ET. Systematic literature review X narrative review. *Acta Paul Enferm.* 2007 Jun;20(2):v-vi. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002007000200001>
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 09, de 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 2011 Mar 16.
14. Shapiro AMJ, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 May;13(5):268-77.
15. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;343(4):230-8. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007273430401>
16. Gala-Lopez B, Kin T, O’Gorman D, Pepper AR, Senior P, Humar A et al. Microbial contamination of clinical islet transplant preparations is associated with very low risk of infection. *Diabetes Technol Ther.* 2013;15(4):323-7. <https://doi.org/10.1089/dia.2012.0297>
17. Collaborative Islet Transplant Registry. CITR 8th Annual Report. 2014[access 2017 Sep 17]. Available from: <https://citregistry.org/content/citr-8th-annual-report>
18. Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND, Eggerman TL, Alejandro R, Bellin MD et al.; Clinical Islet Transplantation Consortium. Phase 3 trial of transplantation of human islets in type 1 diabetes complicated by severe hypoglycemia. *Diabetes Care.* 2016;39(7):1230-40. <https://doi.org/10.2337/dc15-1988>
19. Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojudice FH, Labriola L et al. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc.* 2004;36(4):1117-8. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.04.065> PMID:15194388
20. Colin C, Demasi MA, Degaki TL, Bustos-Valenzuela JC, Figueira RCS, Montor WR et al. NUCEL (Cell and Molecular Therapy Center): a multidisciplinary center for translational research in Brazil. *Mol Biotechnol.* 2008;39(2):89-95. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9052-9>
21. Percegon LS, Aita CA, Pereira E, Sotta ED, Silva IC, Riella MC. [Clinical protocol for selection of the candidates for islet transplantation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(3):506-14. Portuguese. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000300011>
22. Matsumoto S, Noguchi H, Naziruddin B, Onaca N, Jackson A, Nobuyo H et al. Improvement of pancreatic islet cell isolation for transplantation. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2007;20(4):357-62. <https://doi.org/10.1080/08998280.2007.11928323>
23. McCall M, Shapiro AM. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7):a007823. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007823>
24. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med.* 2006;355(13):1318-30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061267>
25. Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD. Islet cell transplantation today. *Langenbecks Arch Surg.* 2007;392(3):239-53. <https://doi.org/10.1007/s00423-007-0183-4>
26. Shapiro AM. State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Curr Diab Rep.* 2011;11(5):345-54. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0217-8>



27. Buder B, Alexander M, Krishnan R, Chapman DW, Lakey JR. Encapsulated islet transplantation: strategies and clinical trials. *Immune Netw.* 2013;13(6):235-9. <https://doi.org/10.4110/ino.2013.13.6.235>
28. Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A et al. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16(6):491-501. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-0523-2>
29. Wang RN, Rosenberg L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol.* 1999;163(2):181-90. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1630181>
30. Campanha-Rodrigues AL, Grazioli G, Oliveira TC, Lisboa AC, Sogayar MC. Therapeutic potential of laminin-biodritin microcapsules for type 1 diabetes mellitus. *Cell Transplant.* 2015;24(2):247-61. <https://doi.org/10.3727/096368913X675160>
31. Mares-Guia TR, Campos-Lisboa ACV, Rodrigues ALC, Grazioli G, Labriola L, Sogaya MC. Composição biopolimérica para o encapsulamento de células, método de produção de um composto biopolimérico para o encapsulamento de células, método para promover a citoproteção de células e uso de um composto bioplímérico para o encapsulamento de células. [Brazilian patent request in 2011].
32. Omami M, McGarrigle JJ, Reedy M, Isa D, Ghani S, Marchese E et al. Islet microencapsulation: strategies and clinical status in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2017;17(7):47. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0877-0>
33. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet.* 1994;343(8903):950-1. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90067-1)
34. Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, Chintinne M, Ling Z, Gillard P, Schoonjans L, Delvaux G et al.; Beta Cell Therapy Consortium EU-FP7. Sustained function of alginate-encapsulated human islet cell implants in the peritoneal cavity of mice leading to a pilot study in a type 1 diabetic patient. *Diabetologia.* 2013 Jul;56(7):1605-14. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2906-0>
35. Tuch BE, Keogh GW, Williams LJ, Wu W, Foster JL, Vaithilingam V et al. Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. *Diabetes Care.* 2009;32(10):1887-9. <https://doi.org/10.2337/dc09-0744>
36. Valdes-Gonzalez R, Rodriguez-Ventura AL, White DJ, Bracho-Blanchet E, Castillo A, Ramirez-González B et al. Long-term follow-up of patients with type 1 diabetes transplanted with neonatal pig islets. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(3):537-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04273.x>
37. Valdés-González RA, Dorantes LM, Garibay GN, Bracho-Blanchet E, Mendez AJ, Dávila-Pérez R et al. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(3):419-27. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01982>
38. Dufrane D, D'hoore W, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. Parameters favouring successful adult pig islet isolations for xenotransplantation in pig-to-primate models. *Xenotransplantation.* 2006;13(3):204-14. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2006.00275.x>
39. Marigliano M, Bertera S, Grupillo M, Trucco M, Bottino R. Pig-to-nonhuman primates pancreatic islet xenotransplantation: an overview. *Curr Diab Rep.* 2011;11(5):402-12. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0213-z>
40. Dufrane D, Gianello P. Pig islets for clinical islet xenotransplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(6):495-500. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328331a8e3>
41. Purified Human Pancreatic Islets, Interim Certificate of Analysis (Product Code PHPI-A-01): Standard operating procedure of the NIH clinical islet transplantation consortium. *CellR4.* 2015;3(1):e1446.
42. Living Cell Technologies - LCT. Products. Diabecell. New Zealand: LCT; 2017[access 2017 Sep 13]. Available from: <http://www.lctglobal.com/products/diabecell/development-to-date>
43. Matsumoto S, Abalovich A, Wechsler C, Wynyard S, Elliott RB. Clinical benefit of islet xenotransplantation for the treatment of type 1 diabetes. *EBioMedicine.* 2016;12:255-62. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.034>
44. 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>
45. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-20. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
46. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
47. Kondo Y, Toyoda T, Inagaki N, Osafune K. iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *J Diabetes Investig.* 2017 Jun 13. <https://doi.org/10.1111/jdi.12702>
48. Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res (Amst).* 2012;8(2):274-84. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.10.002>
49. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006;24(11):1392-401. <https://doi.org/10.1038/nbt1259>



50. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH et al. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell*. 2014;159(2):428-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>
51. Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1121-33. <https://doi.org/10.1038/nbt.3033>
52. Viacyte Regeneration Health. PEC-Encap™ (VC-01™): improving diabetes treatment. San Diego: Viacyte, 2017[access 2017 Sep 13]. Available from: <http://viacyte.com/products/pec%e2%80%90encap-vc-01/>
53. Kohn DB, Candotti F. Gene therapy fulfilling its promise. *N Engl J Med*. 2009;360(5):518-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMe0809614>
54. Brasil. Lei N° 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1° 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 N° 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória N° 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5°, 6°, 7°, 8°, 9°, 10° e 16° da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 2005 Mar 28.
55. Brasil. Lei N° 8.489, de 18 de novembro de 1992. Dispõe sobre a retirada e transplante de tecidos, órgãos e partes do corpo humano, com fins terapêuticos e científicos e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1992 Nov 20.
56. Handorf AM, Sollinger HW, Alam T. Insulin gene therapy for type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Transplant*. 2015;13 Suppl 1:37-45. <https://doi.org/10.6002/ect.mesot2014.L67>
57. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1994;331(21):1428-36. <https://doi.org/10.1056/NEJM199411243312107>
58. Li W, Nakanishi M, Zumsteg A, Shear M, Wright C, Melton DA, Zhou Q. In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *eLife* 2014;3:e01846.
59. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*. 2008;455(7213):627-32. <https://doi.org/10.1038/nature07314>
60. Mauda-Havakuk M, Litichever N, Chernichovski E, Nakar O, Winkler E, Mazkereth R et al. Ectopic PDX-1 expression directly reprograms human keratinocytes along pancreatic insulin-producing cells fate. *PLoS One*. 2011;6(10):e26298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026298>
61. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med*. 2000;6(5):568-72. <https://doi.org/10.1038/75050>
62. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31950-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303127200>
63. Shternhall-Ron K, Quintana FJ, Perl S, Meivar-Levy I, Barshack I, Cohen IR et al. Ectopic PDX-1 expression in liver ameliorates type 1 diabetes. *J Autoimmun*. 2007;28(2-3):134-42. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.010>
64. Kon OL, Sivakumar S, Teoh KL, Lok SH, Long YC. Naked plasmid-mediated gene transfer to skeletal muscle ameliorates diabetes mellitus. *J Gene Med*. 1999;1(3):186-94. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-2254\(199905/06\)1:3<186::AID-JGM33>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-2254(199905/06)1:3<186::AID-JGM33>3.0.CO;2-W)
65. Alam T, Wai P, Held D, Vakili ST, Forsberg E, Sollinger H. Correction of diabetic hyperglycemia and amelioration of metabolic anomalies by minicircle DNA mediated glucose-dependent hepatic insulin production. *PLoS One*. 2013;8(6):e67515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067515>
66. Croze F, Prud'homme GJ. Gene therapy of streptozotocin-induced diabetes by intramuscular delivery of modified preproinsulin genes. *J Gene Med*. 2003;5(5):425-37. <https://doi.org/10.1002/jgm.359>
67. Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation*. 2002;74(12):1781-7. <https://doi.org/10.1097/00007890-200212270-00024>
68. Olson DE, Paveglio SA, Huey PU, Porter MH, Thulé PM. Glucose-responsive hepatic insulin gene therapy of spontaneously diabetic BB/Wor rats. *Hum Gene Ther*. 2003;14(15):1401-13. <https://doi.org/10.1089/104303403769211628>
69. Callejas D, Mann CJ, Ayuso E, Lage R, Grifoll I, Roca C et al. Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes*. 2013;62(5):1718-29. <https://doi.org/10.2337/db12-1113>
70. Park YM, Woo S, Lee GT, Ko JY, Lee Y, Zhao ZS et al. Safety and efficacy of adeno-associated viral vector-mediated insulin gene transfer via portal vein to the livers of streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *J Gene Med*. 2005;7(5):621-9. <https://doi.org/10.1002/jgm.708>
71. Hsu PY, Kotin RM, Yang YW. Glucose- and metabolically regulated hepatic insulin gene therapy for diabetes. *Pharm Res*. 2008;25(6):1460-8. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9539-x>
72. Kolodka TM, Finegold M, Moss L, Woo SL. Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(8):3293-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3293>
73. Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL. Hepatic insulin gene expression as treatment for type 1 diabetes mellitus in rats. *Mol Endocrinol*. 1997;11(6):833-7. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0017>



74. Ren B, O'Brien BA, Byrne MR, Ch'ng E, Gatt PN, Swan MA et al. Long-term reversal of diabetes in non-obese diabetic mice by liver-directed gene therapy. *J Gene Med*. 2013;15(1):28-41. <https://doi.org/10.1002/jgm.2692>
75. Ren B, O'Brien BA, Swan MA, Koina ME, Nassif N, Wei MQ et al. Long-term correction of diabetes in rats after lentiviral hepatic insulin gene therapy. *Diabetologia*. 2007;50(9):1910-20. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0722-0>
76. Elsner M, Terbish T, Jörns A, Naujok O, Wedekind D, Hedrich HJ et al. Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. *Mol Ther*. 2012;20(5):918-26. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.8>
77. Brown BN, Barnes CA, Kasick RT, Michel R, Gilbert TW, Beer-Stolz D et al. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31(3):428-37. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.061>
78. Stern MM, Myers RL, Hammam N, Stern KA, Eberli D, Kritchevsky SB et al. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. *Biomaterials*. 2009;30(12):2393-9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.069>
79. Cheng NC, Estes BT, Awad HA, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(2):231-41. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0253>
80. Sellaro TL, Ranade A, Faulk DM, McCabe GP, Dorko K, Badylak SF et al. Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(3):1075-82. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0587>
81. Cortiella J, Niles J, Cantu A, Brettler A, Pham A, Vargas G et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(8):2565-80. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0730>
82. Allen RA, Seltz LM, Jiang H, Kasick RT, Sellaro TL, Badylak SF et al. Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(11):3363-74. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0005>
83. Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer* 2010;46(7):1181-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.027>
84. Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials*. 2010;31(29):7475-84. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.039>
85. Mirmalek-Sani SH, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013;34(22):5488-95. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.054>
86. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013;34(28):6760-72. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.066>
87. Peloso A, Urbani L, Cravedi P, Katari R, Maghsoudlou P, Fallas ME et al. The human pancreas as a source of protolerogenic extracellular matrix scaffold for a new-generation bioartificial endocrine pancreas. *Ann Surg*. 2016;264(1):169-79. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001364>
88. Tian XH, Xue WJ, Pang XL, Teng Y, Tian PX, Feng XS. Effect of small intestinal submucosa on islet recovery and function in vitro culture. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2005;4(4):524-9.
89. De Carlo E, Baiguera S, Conconi MT, Vigolo S, Grandi C, Lora S et al. Pancreatic acellular matrix supports islet survival and function in a synthetic tubular device: in vitro and in vivo studies. *Int J Mol Med*. 2010;25(2):195-202. <https://doi.org/10.3892/ijmm.00000330>
90. Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:43. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00043>
91. Ouziel-Yahalom L, Zalzman M, Anker-Kitai L, Knoller S, Bar Y, Glandt M et al. Expansion and redifferentiation of adult human pancreatic islet cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(2):291-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.187>
92. Ackermann AM, Gannon M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol*. 2007;38(1-2):193-206. <https://doi.org/10.1677/JME-06-0053>
93. Lee YC, Nielsen JH. Regulation of beta cell replication. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;297(1-2):18-27. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.08.033>
94. Labriola L, Ferreira GB, Montor WR, Demasi MA, Pimenta DC, Lojudice FH et al. Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;264(1-2):16-27. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.004>
95. Mantovani MC, da Conceição MM, Ferreira AJ, Labriola L, dos Santos PB, Tonso A et al. Immobilization of primary cultures of insulin-releasing human pancreatic cells. *Islets*. 2009;1(3):224-31. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9695>
96. Brady AC, Martino MM, Pedraza E, Sukert S, Pileggi A, Ricordi C et al. Proangiogenic hydrogels within macroporous scaffolds enhance islet engraftment in an extrahepatic site. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(23-24):2544-52. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0686>
97. Menger MD, Messmer K. Pancreatic islet transplantation: isolation, separation, and microvascularization. *Wien Klin Wochenschr*. 1992;104(15):429-33.
98. De Leu N, Heremans Y, Coppens V, Van Gassen N, Cai Y, D'Hoker J et al. Short-term overexpression of VEGF-A in mouse beta cells indirectly stimulates their proliferation and protects against diabetes. *Diabetologia*. 2014;57(1):140-7. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3076-9>



99. Watada H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocr J*. 2010;57(3):185-91. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K09E-035>
100. Inoue M, Hager JH, Ferrara N, Gerber HP, Hanahan D. VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2002;1(2):193-202. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00031-4)
101. Conselho Nacional de Saúde - CNS. Resolução Nº 196, de 10 de outubro de 1996. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial União*. 1996 Oct 16.
102. Paradigmas para a regulação de produtos derivados de células e tecidos humanos 2010 - Busca - Anvisa [Internet]. [access 2017 Sep 20]. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=331252&_101_type=document
103. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Seminário nacional sobre regulação em terapias celulares: relatório. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2012[access 2017 Sep 20]. Available from: <http://docplayer.com.br/8808866-Seminario-nacional-sobre-regulacao-em-relatorio.html>
104. Senado Federal (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal; 1988.
105. Brasil. Lei Nº 4.280, de 6 de novembro de 1963. Dispõe sobre a extirpação de órgãos ou tecidos de pessoa falecida. *Diário Oficial União*. 1963 Nov 11.
106. Brasil. Lei Nº 5.479, de 10 de agosto de 1968. Dispõe sobre a retirada e transplante de tecidos, órgãos e partes do corpo humano, incluindo doadores vivos, com fins terapêuticos e científicos e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1968 Aug 14.
107. Brasil. Lei Nº 8.489, de 18 de novembro de 1992. Dispõe sobre a retirada e transplante de tecidos, órgãos e partes do corpo humano, com fins terapêuticos e científicos e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1992 Nov 20.
108. Brasil. Lei Nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1997 Feb 5.
109. Brasil. Lei Nº 10.211, de 23 de março de 2001. Altera dispositivos da Lei Nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997, que “dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento.” *Diário Oficial União*. 2011 Mar 24.
110. Conselho Federal de Medicina - CFM. Resolução CFM Nº 1.358, de 28 de maio de 1992. Adota normas éticas para utilização das técnicas de reprodução assistida. *Diário Oficial União*. 1992 Nov 19.
111. Brasil. Lei Nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1997 Feb 5.
112. Conselho Federal de Medicina - CFM. Resolução CFM Nº 1.957, de 15 de dezembro de 2010. A Resolução CFM Nº 1.358/92, após 18 anos de vigência, recebeu modificações relativas à reprodução assistida, o que gerou a presente resolução, que a substitui in totum. *Diário Oficial União*. 2011 Jan 6.
113. Brasil. Lei Nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995. Regulamenta os incisos II e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados, autoriza o Poder Executivo a criar, no âmbito da Presidência da República, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1995 Jan 6.
114. Brasil. Lei Nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. *Diário Oficial União*. 1996 May 15.
115. Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 196, de 10 de outubro de 1996. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial União*. 1996 Oct 16.
116. Brasil. Lei Nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998. Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1998 Feb 22.
117. Brasil. Lei Nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 1999 Jan 27.
118. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre normas técnicas sobre infraestrutura física, contemplando programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. *Diário Oficial União*. 2002 Jun 13.
119. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 190, de 18 de julho de 2003. Dispõe sobre determinação de normas técnicas para o funcionamento dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário. *Diário Oficial União*. 2003 Jul 21.
120. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 210, de 4 de agosto de 2003. Dispõe sobre normas técnicas sobre as Boas Práticas de Fabricação (BPFs) de medicamentos. *Diário Oficial União*. 2003 Aug 14.
121. Brasil. Lei Nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004. Dispõe sobre incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 2004 Dec 3.
122. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 153, de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. *Diário Oficial União*. 2004 Jun 24.



123. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial União. 2004 Dec 10.
124. Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde - CNS. Resolução N° 347, de 13 de janeiro de 2005. Regula o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa. Diário Oficial União. 2005 Mar 10.
125. Narahashi L, Carvalho ACC, Araújo HP. Regulamentação das terapias celulares no Brasil. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):19-24. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00274>
126. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 315 de 26 de outubro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de registro, alterações pós-registro e revalidação de registro dos Produtos Biológicos Terminados. Diário Oficial União. 2005 Oct 31.
127. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. RDC N° 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Diário Oficial União. 2010 Dec 16.
128. Brasil. Lei N° 11.196, de 21 de novembro de 2005. Institui o Regime Especial de Tributação para a Plataforma de Exportação de Serviços de Tecnologia da Informação - REPEs, o Regime Especial de Aquisição de Bens de Capital para Empresas Exportadoras - RECAP e o Programa de Inclusão Digital; dispõe sobre incentivos fiscais para a inovação tecnológica. Diário Oficial União. 2005 Nov 22.
129. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 56, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoéticas (CPH) provenientes de medula óssea e sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, para finalidade de transplante convencional e dá outras providências. Diário Oficial União. 2006 Dec 18.
130. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 19, de 23 de março de 2012. Altera a Resolução RDC N° 56, de 16 de dezembro de 2010, que dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos laboratórios de células progenitoras hematopoéticas (CPH) provenientes de medula óssea e sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, para finalidade de transplante convencional e dá outras providências. Diário Oficial União. 2012 Mar 28.
131. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 23, de 27 de maio de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências. Diário Oficial União. 2011 May 30.
132. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 72, de 30 de março de 2016. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 23, de 27 de maio de 2011, que dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências. Diário Oficial União. 2016 Apr 1.
133. Brasil. Lei N° 8.489, de 18 de novembro de 1992. Dispõe sobre a retirada e transplante de tecidos, órgãos e partes do corpo humano, com fins terapêuticos e científicos e dá outras providências. Diário Oficial União. 1992 Nov 20.
134. Silveira RCCP, Galvão CM. [Nursing care and Hickman's catheter: the search for evidence]. *Acta Paul Enferm*. 2005;18(3):276-84. Portuguese. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002005000300008>
135. Marodin G, Salgueiro JB, Motta ML, Santos LMP. Brazilian guidelines for biorepositories and biobanks of human biological material. *Rev Assoc Médica Bras*. 2013;59(1):72-7. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302013000100014>
136. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. [Cell therapy and stem cells research funding in Brazil]. *Rev Saúde Pública*. 2010;44(4):763-4. Portuguese. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102010000400022>
137. Ministério da Saúde B. Portaria N° 2.201, de 14 de setembro de 2011. Diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano com finalidade de pesquisa. Diário Oficial União. 2011 Sep 15.
138. Visiongain. Diabetes treatments: World Drug Market 2013-2023. London: Visiongain; 2013.
139. Brasil. Lei Federal N° 11.347, de 27 de setembro de 2006. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos e materiais necessários à sua aplicação e à monitoração da glicemia capilar aos portadores de diabetes inscritos em programas de educação para diabéticos. Diário Oficial União. 2006 Sep 28.

Acknowledgments

The CTC (Cell Technologies Center) named Nucel (Cell and Molecular Therapy Center), São Paulo University Medical School, seeks alternative treatments for T1DM and is partially supported by BNDES, Capes, CNPq, Fapesp, Finep, MCTI and MS-Decit. We would like to express our gratitude to the National Technical Commission on Biosafety (CTNBio) and the National Health Surveillance Agency (Anvisa) for sharing their knowledge with us and for ensuring safety and efficacy of our TDM1 research.

Conflict of Interest

Authors have no potential conflict of interest to declare, related to this study's political or financial peers and institutions.



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.

Uso de nanopartículas no rastreamento de células em terapias avançadas: possibilidades e desafios para a aplicação clínica

Use of nanoparticles in cell tracing in advanced therapies: possibilities and challenges for clinical application

RESUMO

Jasmin^{1*}

Radovan Borojevic^{II}

Introdução: Para uma regulamentação específica e implementação das novas tecnologias avançadas na clínica médica, é preciso refinar o conhecimento sobre as células utilizadas. Um dos maiores desafios está na dificuldade em determinar os mecanismos de funcionamento das células após a terapia. **Objetivo:** Compreender, usando os métodos de rastreamento celular em pacientes, a distribuição e a função de células usadas em terapias avançadas. **Método:** Este trabalho foi elaborado pelo levantamento de artigos científicos nas bases de dados internacionais e da legislação vigente sobre a utilização clínica das nanopartículas. **Resultados:** Constatamos que a nanotecnologia já é uma ferramenta de grande utilidade, pois diversas nanopartículas magnéticas já são aprovadas para uso clínico; elas podem ser incorporadas por células e visualizadas por imagens de ressonância magnética. O presente texto discute as perspectivas sobre uso de nanomedicamentos para rastreamento celular na clínica médica. **Conclusões:** A utilização das nanopartículas necessita a elaboração e aprovação de leis, guias e normas que orientem a indústria, como outros setores, sobre a caracterização dos nanomateriais e potenciais riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas Magnéticas; Rastreamento Celular; Células-tronco; Terapias Avançadas; Nanomedicamentos

ABSTRACT

Introduction: Regulation and introduction of new advanced cellular technologies in clinics requires better knowledge on the used cells. One of the major challenges is the difficulty to accurately determine the mechanisms of cell activities when submitted to advanced therapies. **Objective:** Understand, using the cell tracking methods, the tissue distribution and the molecular response of cells exposed to advanced therapies. **Methods:** This work was done as an integrated review of data collected in international data-bases and of legislations concerning the clinical use of nanoparticles. **Results:** Nanotechnology is a very useful tool for cell tracking in vivo, and several nanoparticles have been already approved for clinical use; they can be incorporated into cells and visualized by magnetic resonance imaging. **Conclusions:** The perspectives on the use of nanomedicines for cellular tracking in medical clinic are promising, requiring elaboration and approval of laws, guides and norms to orient the industrial sectors, regarding the nanomaterials characterization and potential risks to human and animal health, as well as to the environment.

KEYWORDS: Magnetic Nanoparticles; Cell Tracking; Stem Cells; Advanced Therapies; Nanomedicine

^I Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Faculdade de Medicina de Petrópolis/FASE, Petrópolis, RJ, Brasil

* E-mail: jasmin@biof.ufrj.br



INTRODUÇÃO

Para a implementação de novas propostas e novos produtos de terapia celular avançada, são necessários ensaios clínicos que demonstrem a ausência de efeitos adversos, e presença de efeitos terapêuticos desejados, inicialmente realizados nas fases I e II. Informações sobre a distribuição das células transplantadas, tanto temporal quanto espacial, são fundamentais para compreender os efeitos dessas novas terapias. Dessa forma, nanopartículas têm sido vastamente exploradas com esse objetivo.

Nos últimos anos, a ciência e a tecnologia em nanoescala têm atraído considerável atenção em diversas áreas de conhecimento, pela expectativa do impacto que os materiais nanoestruturados podem causar na sociedade. Em virtude de suas propriedades físico-químicas singulares, uma infinidade de produtos de uso cotidiano incorporou nanomateriais em sua fabricação, como tecidos resistentes a manchas e que não amassam; microprocessadores; brinquedos resistentes a germes; baterias de longa vida; lâmpadas do tipo LED e plásticos biodegradáveis. Além disso, uma série de produtos com aplicação no corpo humano também já foram desenvolvidos, como cosméticos e filtros solares, e mesmo alguns de aplicação interna, como medicamentos, válvulas cardíacas, marca-passo, cateteres e implantes ortopédicos^{1,2}.

Não existem nanopartículas aprovadas para uso humano especificamente produzidas para o rastreamento celular, porém existem diversas nanopartículas magnéticas aprovadas para o diagnóstico ou a terapia, e que podem ser alternativamente utilizadas no rastreamento celular. No presente texto, analisaremos as perspectivas de uso das nanopartículas no rastreamento de células, em especial sobre as metodologias que podem ser prontamente utilizadas na clínica médica. Além disso, será discutida a necessidade de elaboração e aprovação de uma legislação que oriente a indústria, como outros setores, sobre a caracterização e potenciais riscos dos nanomateriais.

MÉTODO

Para esta revisão foi consultada a literatura científica relacionada principalmente às nanopartículas magnéticas aprovadas clinicamente e ao rastreamento de células em terapias, juntamente com o arcabouço legal pertinente. A pesquisa por artigos científicos foi realizada na base de dados PubMed e *Google Scholar*, e a pesquisa pelo arcabouço legal foi realizada nas publicações disponíveis no portal eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), da Câmara dos Deputados e do Governo Federal. Foram utilizadas palavras-chave como: nanopartículas, nanotecnologia, nanomedicamentos, nanopartículas superparamagnética de óxido de ferro, marcação celular, rastreamento celular, rastreamento *in vivo*, tecnologia de imagens moleculares, toxicidade de nanopartículas, terapias avançadas, células-tronco (tanto na língua portuguesa quanto na inglesa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nanotecnologia

Um primeiro ponto que chama a atenção em nanotecnologia é a definição do termo: não há um consenso, pois se trata de uma área diversa que abrange um grande conjunto de tecnologias. Atualmente, nanomateriais são definidos principalmente pelo tamanho que apresentam. Alguns autores consideram como nanomateriais apenas estruturas de 1 a 100 nm de tamanho em umas das dimensões³; outros aceitam tamanhos maiores, como na definição da *International Standards Organization* (ISO), que determina que a nanotecnologia inclui o controle da matéria e dos processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nm em uma ou mais dimensões⁴. No Brasil, de acordo com o Projeto de Lei (PL) nº 6.741, de 2013, o termo nanotecnologia se refere à “manipulação de matérias em uma escala que vai de 1 a 100 nm, em pelo menos uma de suas dimensões”. Ainda define o termo nanomaterial, que diz respeito ao “material com uma ou mais dimensões externas, ou com estrutura interna, baseadas na nanoescala, que pode exibir novas características”. Estas definições brasileiras refletem a dificuldade em determinar o termo, já que a nanotecnologia está definida pelo tamanho máximo de 100 nm, e o nanomaterial é aceito dentro da dimensão nanométrica, permitindo, assim, materiais com até 1.000 nm. Uma definição precisa e internacional é importante para regulamentação e comercialização (importação e exportação) dos materiais produzidos a partir de materiais em nanoescala.

Em um artigo chamado “não defina nanomateriais” (tradução livre), o autor argumenta que é necessária uma definição baseada na ciência dos nanomateriais, focando nas novas propriedades e fenômenos observados, e não somente na definição de tamanho⁵. No presente texto iremos tratar o termo nanomateriais como aqueles produzidos na escala nano, ou seja, os compreendidos entre 1 a 1.000 nm.

Nanopartículas

Nanomateriais podem ser divididos em partículas ou fibras que possuem a faixa nanométrica em uma de suas dimensões. Nanopartículas que são definidas com partículas coloidais sólidas (nanosferas) ou tipos vesiculares (nanocápsulas). Novas técnicas de síntese têm permitido a produção de nanopartículas com outros formatos não esféricos, como prisma, hexágono, cubo, entre outros⁶.

Uso de nanopartículas na área médica

A nanomedicina é um termo da medicina contemporânea que surgiu com a junção da medicina e da nanotecnologia. Consiste no uso de nanomateriais em métodos terapêuticos e de diagnóstico. No campo dos nanomedicamentos, tem sido bem-aceito um tamanho que varie de poucos nanômetros até 1.000 nm de diâmetro. Na prática, a gama útil de nanomedicamentos normalmente se enquadra na faixa de 5-250 nm⁷. Alguns fármacos têm



se mostrado menos tóxicos e mais eficientes quando nanoencapsulados do que em seu estado livre^{8,9}. Adicionalmente, tem sido investigado o uso de células-tronco como carreadoras de fármacos nanoencapsulados, principalmente no tratamento de glioma, pois uma propriedade característica das células-tronco, como as células mesenquimais, é sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e seu tropismo para células tumorais^{10,11,12,13}.

Outra possibilidade do uso de nanopartículas em medicina é a sua internalização por células-tronco para rastreamento *in vivo*, que é o principal foco do presente texto. Os mecanismos de funcionamento das novas terapias celulares podem ser, em parte, compreendidos através do rastreamento das células após transplante no paciente. Diversos estudos, inclusive os do nosso grupo, têm mostrado a marcação das células de forma eficiente^{10,15,16}.

Métodos disponíveis de marcação celular

Existem diferentes formas para a marcação celular. Essencialmente, estas se dividem em duas categorias: marcação indireta e direta. A marcação indireta inclui a modificação genética da célula para que esta expresse uma molécula sinal ou que aumente a afinidade por agentes de contraste^{17,18}. Os potenciais riscos derivados da manipulação genética dificultam a aprovação clínica desse procedimento. A marcação direta consiste na incubação das células diretamente com marcadores através de um procedimento simples de incorporação, sem a necessidade de manipulação genética. Existem diferentes técnicas de marcação direta que permitem a incorporação dos marcadores tanto durante o cultivo celular como em células frescas^{19,20,21}. Esta última possibilidade é essencial quando a terapia celular é planejada sem o pré-cultivo celular.

Os marcadores mais utilizados são os radionucleotídeos, nanopartículas fluorescentes e/ou magnéticas. Os radionucleotídeos são substâncias emissoras de radiação que podem ser visualizados por tomografia por emissão de pósitrons (PET) e tomografia por emissão de fóton único (SPECT). Diversos radiofármacos são aprovados para tratamento e diagnóstico *in vivo*, e podem ser utilizados para rastreamento celular. A maior desvantagem da técnica é o tempo de meia-vida dos marcadores, o qual é, em geral, reduzido a algumas horas. Isso traz duas consequências: a primeira é que o tempo de rastreamento das células *in vivo* é curto e a segunda é o breve tempo disponível para transportar os radioisótopos, pois eles são produzidos por equipamentos específicos, como aceleradores de partículas ou reatores nucleares. No Brasil, existem poucas unidades produtoras de radiofármacos, sendo a principal situada em São Paulo, no Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, que produz 38 diferentes radiofármacos²².

A marcação das células com nanopartículas fluorescentes é interessante em pesquisa pré-clínica, pois é uma técnica com baixo custo e com alta disponibilidade de marcadores fluorescentes⁶. Entretanto, esta técnica não pode ser aplicada clinicamente, pois a luz fluorescente tem baixa capacidade de penetração na superfície do corpo, limitada a milímetros.

Comparativamente às técnicas descritas acima, atualmente, a que apresenta maior disponibilidade e aplicabilidade clínica

é o rastreamento por imagens de ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*), através da marcação das células com nanopartículas magnéticas. Esta técnica apresenta alta resolução espacial e a vantagem de que dados funcionais do paciente podem ser coletados simultaneamente com os dados de rastreamento. Uma das maiores desvantagens da técnica é a baixa sensibilidade quando comparada aos marcadores fluorescentes ou radioativos. Diversas nanopartículas paramagnéticas de complexos ligantes de íons metálicos, como gadolínio²³, e nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONS, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*)²⁴ estão aprovadas para diagnóstico ou terapia em pacientes. A marcação e o rastreamento de células utilizando-se nanopartículas de gadolínio ou SPIONS têm se mostrado eficazes^{25,26}. Porém, as SPIONS são as nanopartículas mais estudadas para este propósito, entre outros fatores, por sua depuração renal ser mais lenta e por apresentar um sinal mais forte por MRI comparando com os agentes de contraste baseados em gadolínio^{27,28}. Em um estudo recente, foi proposto um método de contraste duplo, usando SPION e gadolínio, o qual permitiria detectar tanto a localização como a morte celular²⁹.

No geral, as técnicas de marcação direta apresentam como maior desvantagem a possibilidade de vazamento dos marcadores do interior celular, levando à perda e/ou difusão do sinal, e gerando resultados pouco confiáveis^{6,18,30}. Por isso, apesar de diversos autores descreverem a possibilidade de rastreamento por longos períodos, de até meses²⁶, nós recomendamos que o rastreamento em pacientes seja realizado por períodos mais curtos, de dias a poucas semanas, para evitar possíveis más interpretações.

A nanopartícula ideal para aplicação clínica não existe, porém esta deveria ser biocompatível, não tóxica, estável em pH fisiológico, permanecer retida apenas nas células marcadas e ser rapidamente eliminada após morte celular. Especificamente para o rastreamento utilizando MRI, uma característica importante é a geração de nanopartículas com alta magnetização, devido à baixa sensibilidade da técnica. Até o momento não existem agentes marcadores com todas essas características e, por isso, os estudos exploram o uso de nanopartículas já disponíveis e aprovadas para uso humano.

Nanopartículas magnéticas aprovadas clinicamente

As SPIONS Feridex/Endorem (120-180 nm de diâmetro) são produzidas para detecção de tumor no fígado, disponibilizadas por AMAG Pharmaceuticals/Guerbet. O Feridex e o Endorem são o mesmo produto, com nomes comerciais diferentes: enquanto o Feridex era produzido em diversos países, como EUA, Japão, Argentina, China, Coreia do Sul, o Endorem era principalmente distribuído na Europa e, no Brasil, porém foram descontinuados e não são mais produzidos. As nanopartículas de Combindex/Sinerem (15-30 nm) são aprovadas para diagnóstico de tumor em linfonodos, disponibilizados por AMAG Pharmaceuticals/Guerbet, e também foram descontinuados. O Resorvist (45-60 nm) possibilita a detecção de tumor de fígado e o Supravist (21 nm) é utilizado para angiografia, ambos comercializados pela Bayer Schering, sendo que o Resorvist foi descontinuado. Excepcionalmente,



o Feraheme (30 nm) não é utilizado para diagnóstico, e sim como suplemento no tratamento de anemias, produzido pela AMAG Pharmaceutical. Todas as nanopartículas mencionadas acima são baseadas em óxido de ferro. Recentemente uma nova formulação do Clariscan (11-20 nm), baseada em gadolínio, para imagens de tumor de microvasculatura, foi aprovada para uso humano pela GE Healthcare. Além disso, com base em gadolínio estão disponíveis também nomes comerciais como Dotarem e Omniscan, indicados para visualizar áreas de ruptura da barreira hematoencefálica ou vascularização anormal no cérebro, medula espinal e tecidos associados (Guerbert e GE Healthcare, respectivamente) e Magnevist (Bayer Schering), sendo esse o primeiro agente de contraste intravenoso a se tornar disponível para uso clínico, e indicado para visualizar vascularização anormal no cérebro e no corpo. Vale ressaltar que os testes realizados com nanomedicamentos são os mesmos realizados com medicamentos convencionais, não havendo testes específicos para medicamentos baseados em nanopartículas.

A descontinuação da produção das nanopartículas tem afetado os estudos sobre rastreamento celular, pois um grande número de trabalhos, inclusive do nosso grupo, foi publicado investigando a marcação de células com materiais que não estão mais disponíveis comercialmente. É importante pontuar que a descontinuação tem ocorrido principalmente por fatores econômicos. Pelo nosso conhecimento, não têm sido registrados casos de toxicidade que culminaram na descontinuação do produto.

Isso mostra uma clara brecha para o desenvolvimento de novas nanopartículas específicas para marcação e rastreamento celular. Atualmente, diversas empresas têm comercializado nanopartículas não aprovadas clinicamente para estudos pré-clínicos, entretanto não está claro se há a intenção de uma futura aprovação clínica.

Através de uma verificação dos produtos medicamentosos registrados na Anvisa, observamos que apenas o Endorem, Dotarem e Omniscan, de todas as nanopartículas citadas acima, estão registrados como medicamentos no Brasil. O Endorem está registrado sob o número 106140022 e teve seu registro vencido em setembro de 2005. O Dotarem está registrado sob o número 149800016 e seu vencimento é para agosto de 2021, enquanto o Omniscan está registrado sob o número 183960003 e venceu em dezembro de 2017³¹. Este pequeno número de nanopartículas magnéticas aprovadas no Brasil limita as opções dos pesquisadores brasileiros, tanto para o possível rastreamento na clínica médica como em estudos pré-clínico, pois não são prontamente importadas.

Uso de nanopartículas aprovadas no rastreamento celular

Para esclarecer como as nanopartículas aprovadas como medicamento podem ser utilizadas no rastreamento celular, vamos utilizar o Feridex como exemplo, o qual é utilizado para detecção de tumor no fígado. Em diagnóstico, o Feridex, preparado em uma solução de 5% de dextrose é administrado como uma infusão por gotejamento durante cerca de 30 min. Uma hora após a injeção intravenosa, as partículas de óxido de ferro são absorvidas pelas células reticuloendoteliais do fígado e do baço,

com uma absorção aproximada de 80% e até 10%, respectivamente. O tecido tumoral não incorpora as partículas e assim permanece, por MRI, com a intensidade de contraste nativo. Uma pequena quantidade de nanopartículas pode ser detectada em outros órgãos, como rins, fígado e cérebro³². De acordo com a bula, o ferro das nanopartículas de Feridex entra no ciclo normal do metabolismo de ferro corporal, evidenciado por aumentos transitórios nos valores de ferro sérico um dia após a administração e aumento nos valores de ferritina no soro 7 dias após a administração. A quantidade de ferro contido numa dose única é de aproximadamente 39 mg para um indivíduo de 70 kg, o que é menos de 1/5 da quantidade de ferro contido em uma bolsa de sangue para transfusão.

Ainda de acordo com a bula do Feridex, em ensaios clínicos, eventos adversos anafiláticos e alérgicos ocorreram em 11 de 2.240 (0,5%) pacientes. Estes eventos incluem dispneia, outros sintomas respiratórios, angioedema, urticária generalizada e hipotensão. Dor aguda nas costas, pernas ou virilha ocorreram em alguns pacientes. Cinquenta e cinco de 2.240 (2,5%) pacientes apresentaram dor intensa o bastante para causar interrupção da infusão. Na maioria dos pacientes, os sintomas se desenvolveram dentro de 1 a 15 minutos.

A dose única recomendada de Feridex é de 0,56 mg de ferro por quilo de peso corporal. Isso significa que um paciente de 70 kg receberá aproximadamente 39 mg de ferro via intravenosa. Para a marcação de células, como para as células-tronco mesenquimais, uma quantidade de 10 pg de ferro incorporado por célula, é considerada suficiente para o rastreamento *in vivo*³³. A quantidade de células injetadas em terapias celulares varia amplamente com o tipo celular, com a doença e com a via de injeção. Supondo uma terapia em que se utilize 1×10^6 células-tronco mesenquimais por kg de peso corporal, em um paciente de 70 kg será administrado 0,7 mg de ferro incorporado às células. Em outras palavras, a quantidade de ferro injetada juntamente com as células é quase 56 vezes menor do que a dose recomendada para o diagnóstico utilizando uma dose única. Este mesmo raciocínio pode ser utilizado para diversas outras nanopartículas magnéticas aprovadas para uso humano e incorporadas, experimentalmente, por células *in vitro*.

Em 2009, foi aprovado um estudo clínico piloto para marcação de células com Endorem para rastreamento por MRI em pacientes saudáveis. Os resultados mostraram que células mononucleares de sangue periférico podem ser marcadas, sem afetar sua viabilidade, capacidade migratória e produção de citocinas (interleucina [IL]-1, IL-6, IL-10, IL-12p70, e fator de necrose tumoral [TNF]) por até 72 horas após marcação. Pacientes saudáveis receberam células marcadas via intramuscular ou intravenosa, foi possível visualizar as células por até 7 dias, e foram principalmente encontradas no fígado e baço. Em conclusão ao estudo, os autores afirmam que a técnica foi eficiente e segura³⁴.

Apesar de a toxicidade dos nanomedicamentos ser testada em seres humanos para aprovação, é importante avaliar os possíveis efeitos tóxicos nas células. A presença das nanopartículas não pode interferir no potencial da terapia celular, por isso, estudos continuam



caracterizando os efeitos das nanopartículas na biologia das células, incluindo viabilidade, influência na migração, na proliferação, na diferenciação e no enxerto. Muitos estudos pré-clínicos mostraram o uso da nanopartículas de forma segura, sem afetar diversos parâmetros celulares^{15,35,36}, outros têm mostrado uma toxicidade relativamente baixa, apontando indução de estresse celular, alterações na expressão de gene, diminuição da taxa de proliferação ou promoção de um ambiente pró-inflamatório^{15,37,38}. Além disso, o efeito tóxico nem sempre é devido à presença das nanopartículas em si, e sim devido à forma como são previamente manipuladas para induzir incorporação pelas células¹⁵.

Para avaliar o efeito das nanopartículas nas células marcadas, mesmo que já tenham sido aprovadas para uso humano, é preciso realizar alguns testes de citotoxicidade *in vitro*. Em células-tronco mesenquimais, por exemplo, sugerimos que sejam avaliadas possíveis alterações no potencial “tronco” destas células, de acordo com a *International Society of Cellular Therapy* as células mesenquimais devem diferenciar *in vitro* em adipócitos, osteócitos e condrócitos, e expressar CD105, CD73 e CD90, e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR. Além disso, sugerimos que, no mínimo, sejam realizados testes que caracterizem a taxa de proliferação e morte celular, estes podem ser aplicados a qualquer tipo celular. Alguns testes mais avançados como expressão gênica, estresse celular, entre outros também podem ser utilizados para determinar citotoxicidade em diferentes tipos celulares.

É importante destacar que, mesmo com a possibilidade de algum nível de toxicidade, este problema pode ser contornado, pois somente uma amostra de células pode ser utilizada para o rastreamento. Neste sentido, existe a necessidade de estudos que visem determinar o número mínimo de células a serem marcadas, e que devem levar em conta principalmente o tipo celular e a via de administração.

Os dados discutidos nesta seção refletem claramente a possibilidade de uso de nanopartículas aprovadas para uso humano no rastreamento de células em pacientes. Entretanto, é essencial que haja uma regulamentação dos nanomedicamentos, independentemente do tipo de aplicação.

Marcos regulatórios em nanotecnologia

Apesar do crescente número de produtos contendo nanotecnologia chegando ao mercado, a avaliação dos riscos das nanopartículas para a saúde e para o meio ambiente ainda é um desafio. Nos EUA, a *Food and Drug Administration* (FDA) e, na Europa, a *European Medicines Agency* (EMA) regulam a segurança sanitária dos produtos nanotecnológicos de uso humano e animal. O FDA tem lançado guias para a indústria, estes não estabelecem definições regulatórias, mas destinam-se a orientar e assessorar a indústria e outros sobre segurança, eficácia ou impacto na saúde pública, bem como sobre o controle pós-comercialização³⁹. De forma semelhante, a EMA tem publicado diversos documentos visando padronizar e orientar a indústria e outros. O comitê europeu *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR), que desenvolve pareceres sobre riscos

emergentes ou recentemente identificados em saúde e meio ambiente, identificou que a avaliação biológica de nanopartículas e/ou produtos que incorporem nanopartículas deve ser realizada caso a caso⁴⁰.

No Brasil, os primeiros PL destinados à regulamentação das nanotecnologias datam de 2005 e 2010, o PL nº 5.076/2005 e PL nº 131/2010, respectivamente, e ambos foram arquivados. A partir de 2012, se iniciaram outros esforços, por parte do governo, para impulsionar o desenvolvimento do tema. A Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (ENCTI) 2012-2015 incluiu a nanotecnologia com um dos “programas prioritários para os setores portadores de futuro”. O tema nanotecnologia continua sendo considerado como área estratégica no ENCTI 2016-2019, o qual foi divulgado em 2016, porém ainda em discussão e não aprovado em sua versão final.

O Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC), através da Portaria nº 245, de 5 abril de 2012, instituiu o Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia (Sis-Nano), que tem como principais objetivos incentivar a pesquisa, o desenvolvimento e a inovação no setor. Ainda em 2012, o MCTIC, juntamente com mais sete Ministérios, entre eles o Ministério da Saúde, através da Portaria nº 510, de 9 de julho, instituiu o Comitê Interministerial de Nanotecnologias, com a finalidade de assessorar diversos Ministérios, bem como aprimorar políticas, diretrizes e ações voltadas para o desenvolvimento das nanotecnologias no país. O Comitê Interministerial de Nanotecnologias aprovou, em 2014, a adesão do Brasil ao projeto europeu NanoReg, que envolve países europeus, e outros como Austrália, Canadá, Coreia do Sul, Estados Unidos e Japão. O NanoReg é um projeto internacional que visa dar suporte técnico e científico a todas as questões de regulação em nanotecnologia.

Desde 2013, estão em discussão na Câmara dos Deputados dois PL, atualmente em regime de tramitação. O PL nº 6.741/2013 que “dispõe sobre a Política Nacional de Nanotecnologia, a pesquisa, a produção, o destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia no país, e dá outras providências”⁴¹. Este projeto está apensado ao PL nº 5.133/2013 que “regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso da nanotecnologia”⁴². Este projeto visa o direito de acesso à informação previsto pelo Código de Defesa do Consumidor.

Um marco legal sobre os produtos contendo nanotecnologia é importante, até pela necessidade de delegar competências às agências e órgãos regulamentadores, como a Anvisa.

Regulamentação de nanotecnologia pela Anvisa

A Anvisa tem um papel fundamental como órgão responsável por fiscalizar a produção e a comercialização de produtos relacionados à saúde, como alimentos, medicamentos e cosméticos. A partir de 2013, o tema nanotecnologia foi inserido na agenda regulatória da agência. Na agenda de 2013-2014, o tema 112 tratou de “nanotecnologia relacionada a produtos e processos sujeitos à vigilância sanitária”, cujo objetivo foi “promover a regulação sanitária referente às inovações tecnológicas decorrentes



da nanotecnologia, tendo em vista a sua importância como área de inovação portadora de futuro, assim como seus potenciais riscos”. Em cumprimento ao tema, foi publicada a Portaria n° 1.358, de 20 agosto de 2014, que instituiu o Comitê Interno de Nanotecnologia da Anvisa. Entre as atribuições do Comitê está a elaboração de normas e guias para a avaliação e controle de produtos que utilizam nanotecnologia. Para o biênio de 2014-2016, a agenda regulatória manteve o tema nanotecnologia como um dos objetos de prioridade. A agenda para os próximos anos está atualmente em discussão⁴³. Porém, apesar dos esforços, pelo nosso conhecimento, ainda não existem normas ou guias que orientem a indústria e outros sobre o desenvolvimento e riscos dos produtos contendo nanotecnologia, como já realizados pelo FDA, nos EUA, e EMA, na comunidade europeia.

Devido a essa falta de regulamentação específica para a nanotecnologia não são exigidos, no momento de registro na Anvisa, testes específicos para garantir a segurança pública dos medicamentos contendo nanomateriais. Outra consequência é a falta de clareza para o consumidor, pois não há obrigatoriedade de informá-lo sobre a presença de nanopartículas nos medicamentos, tanto na bula como no rótulo da embalagem, lembrando que o PL que define a rotulagem está em tramitação desde 2013. Dessa forma, existe a possibilidade de haver diversos produtos registrados não identificados como nanotecnológicos.

Testes específicos na área de nanotecnologia exigem pessoas especializadas, equipamentos sofisticados e avaliação de qualidade que abrangem outros parâmetros além do tamanho da partícula, os quais ainda precisam ser definidos. Além disso, é importante uma

avaliação de risco que deve ser realizada caso a caso, como orientada pelas agências regulatórias norte-americanas e europeias.

CONCLUSÕES

O rastreamento celular permite compreender melhor os mecanismos de funcionamentos das terapias celulares avançadas, facilitando, assim, a aprovação de diversas terapias ainda em fase experimental. Para isso, é possível utilizar nanopartículas magnéticas comercializadas como medicamentos na marcação e rastreamento das células transplantadas. Sugerimos não ser necessária uma regulamentação específica para o uso destes nanomedicamentos no rastreamento celular, pois estes produtos estão aprovados em consonância com as normas vigentes, e a quantidade utilizada para o rastreamento é muito inferior àquela já aprovada para outros usos clínicos. Entretanto, é importante o estabelecimento de uma regulamentação para os medicamentos nanotecnológicos em geral, garantindo o uso de forma segura e com responsabilidade ambiental. Os ensaios específicos devem ser realizados por pessoal e equipamentos especializados, capazes de caracterizar os diversos nanomateriais e verificar a toxicidade. Parâmetros dos nanomateriais, além do tamanho da partícula, ainda precisam ser definidos. Ainda, é importante estabelecer formas de descarte e destruição dos materiais a fim de minimizar os potenciais riscos. Neste sentido, podemos apontar alguns esforços iniciais realizados no âmbito do MCTIC e da Anvisa, porém leis, guias e normas orientando a indústria, como outros setores, precisam ser elaborados e aprovados pelos órgãos responsáveis, e o direito do consumidor de acesso à informação, preservado.

REFERÊNCIAS

1. Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials*. 2007;28(2):354-69. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.049>
2. Koo OM, Rubinstein I, Onyukel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine*. 2005;1(3):193-212. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.06.004>
3. Zamborini FP, Bao L, Dasari R. Nanoparticles in measurement science. *Anal Chem*. 2012;84(2):541-76. <https://doi.org/10.1021/ac203233q>
4. International Organization for Standardization - ISO. ISO/TC 229: Nanotechnologies. Geneva: International Organization for Standardization; 2005[acesso 26 set 2017]. Disponível em: <https://www.iso.org/committee/381983.html>
5. Maynard AD. Don't define nanomaterials. *Nature*. 2011;475(7354):31. <https://doi.org/10.1038/475031a> PMID:21734686
6. Accomasso L, Gallina C, Turinetto V, Giachino C. Stem Cell tracking with nanoparticles for regenerative medicine purposes: an overview. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7920358. <https://doi.org/10.1155/2016/7920358>
7. Garnett MC, Kallinteri P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup Med (Lond)*. 2006;56(5):307-11. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql052>
8. Mudshinge SR, Deore AB, Patil S, Bhalgat CM. Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J*. 2011;19(3):129-41. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.001>
9. Graça D, Louro H, Santos J, Dias K, Almeida AJ, Gonçalves L et al. Toxicity screening of a novel poly(methylmethacrylate)-Eudragit nanocarrier on L929 fibroblasts. *Toxicol Lett*. 2017;276:129-37. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.017>
10. Kosztowski T, Zaidi HA, Quiñones-Hinojosa A. Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(5):597-612. <https://doi.org/10.1586/era.09.22>
11. Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne MC, Passirani C, Sindji L, Schiller P et al. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(32):8393-401. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.048> PMID:20688391



12. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 2005;65(8):3307-18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>
13. Wu X, Hu J, Zhou L, Mao Y, Yang B, Gao L et al. In vivo tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant gliomas using magnetic resonance imaging. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2008;108(2):320-9. <https://doi.org/10.3171/JNS/2008/108/2/0320>
14. Jasmin, Jelicks LA, Tanowitz HB, Peters VM, Mendez-Otero R, Carvalho AC et al. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect.* 2014;16(11):923-35. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.08.016>
15. Jasmin, Torres AL, Nunes H, Passipieri J, Jelicks L, Gasparetto E, et al. Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and in vivo visualization by magnetic resonance imaging. *J Nanobiotechnology.* 2011;9:4. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-4>
16. Nold P, Hartmann R, Feliu N, Kantner K, Gamal M, Pelaz B, et al. Optimizing conditions for labeling of mesenchymal stromal cells (MSCs) with gold nanoparticles: a prerequisite for in vivo tracking of MSCs. *J Nanobiotechnology.* 2017;15(1):24. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0258-5>
17. Genove G, DeMarco U, Xu H, Goins WF, Ahrens ET. A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. *Nat Med.* 2005;11(4):450-4. <https://doi.org/10.1038/nm1208>
18. Hong H, Yang Y, Zhang Y, Cai W. Non-invasive cell tracking in cancer and cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2010;10(12):1237-48. <https://doi.org/10.2174/156802610791384234>
19. Jasmin, Torres AL, Jelicks L, Carvalho AC, Spray DC, Mendez-Otero R. Labeling stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: analysis of the labeling efficacy by microscopy and magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol.* 2012;906:239-52. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_18
20. Qiu B, Xie D, Walczak P, Li X, Ruiz-Cabello J, Minoshima S et al. Magnetosonoporation: instant magnetic labeling of stem cells. *Magn Reson Med.* 2010;63(6):1437-41. <https://doi.org/10.1002/mrm.22348>
21. Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, Lin S, Bulte JW. Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation. *Magn Reson Med.* 2005;54(4):769-74. <https://doi.org/10.1002/mrm.20701>
22. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (BR). Comissão Nacional de Energia Nuclear. RMB e a produção de radiofármacos. Brasília, DF: Comissão Nacional de Energia Nuclear; 2015[acesso 26 set 2015]. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/radiofarmacos>
23. Zhou Z, Lu ZR. Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2013;5(1):1-18. <https://doi.org/10.1002/wnan.1198>
24. Wang YX. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg.* 2011;1(1):35-40. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03>
25. Guenoun J, Koning GA, Doeswijk G, Bosman L, Wielopolski PA, Krestin GP et al. Cationic Gd-DTPA liposomes for highly efficient labeling of mesenchymal stem cells and cell tracking with MRI. *Cell Transplant.* 2012;21(1):191-205. <https://doi.org/10.3727/096368911X593118>
26. Guzman R, Uchida N, Bliss TM, He D, Christopherson KK, Stellwagen D et al. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(24):10211-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608519104>
27. Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(1-2):24-46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.006>
28. Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(30):10901-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403918101>
29. Ngen EJ, Wang L, Kato Y, Krishnamachary B, Zhu W, Gandhi N et al. Imaging transplanted stem cells in real time using an MRI dual-contrast method. *Sci Rep.* 2015;5(1):13628. <https://doi.org/10.1038/srep13628>
30. Grimm J, Kircher MF, Weissleder R. [Cell tracking: principles and applications]. *Radiologe.* 2007;47(1):25-33. German. <https://doi.org/10.1007/s00117-006-1449-5>
31. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Consultas / Medicamentos. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2017[acesso 26 set 2017]. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>
32. Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol.* 1989;152(1):167-73. <https://doi.org/10.2214/ajr.152.1.167>
33. Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY et al. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood.* 2004;104(4):1217-23. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0655>
34. Richards JM, Shaw CA, Lang NN, Williams MC, Semple SI, MacGillivray TJ et al. In vivo mononuclear cell tracking using superparamagnetic particles of iron oxide: feasibility and safety in humans. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2012;5(4):509-17. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.112.972596>



35. Balakumaran A, Pawelczyk E, Ren J, Sworder B, Chaudhry A, Sabatino M et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeling of bone marrow stromal (mesenchymal) cells does not affect their “stemness”. *PLoS One*. 2010;5(7):e11462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011462>
36. Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, Khakoo AY, Fellowes V, Read EJ et al. Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed*. 2005;18(8):553-9. <https://doi.org/10.1002/nbm.991>
37. Doak SH, Manshian B, Jenkins GJ, Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat Res*. 2012;745(1-2):104-11. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.09.013>
38. Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol*. 2007;4(1):2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-2>
39. U.S. Food and Drug Administration - FDA. FDA Issues three final guidances related to nanotechnology applications in regulated products, including cosmetics and food substances. Silver Spring: U.S. Food and Drug Administration; 2014[acesso 26 set 2017]. Disponível em: <https://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm301093.htm>
40. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Paris: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks; 2006[acesso 26 set 2017]. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_003b.pdf
41. Câmara dos Deputados (BR). PL 6741/2013 2013. Dispõe sobre a Política Nacional de Nanotecnologia, a pesquisa, a produção, o destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia no país, e dá outras providências. Brasília, DF: Câmara dos Deputados; 2017[acesso 26 set 2017]. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=600333>
42. Câmara dos Deputados (BR). PL 5133/2013. Regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso da nanotecnologia. Brasília, DF: Câmara dos Deputados; 2017[acesso 2017 26 set]. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=567257&ord=1>
43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Agenda regulatória. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2017[acesso 2017 26 set]; Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/agenda-regulatoria>

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.

Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted Reconstructed Human Epidermis model in Brazil

Implementação, disponibilidade e contexto regulatório de um modelo de Epiderme Humana Reconstruída no Brasil aceito pela OECD

ABSTRACT

Rodrigo De Vecchi^{1,6,*}

Vanja Dakic^{1,6}

Guilherme Mattos¹

Anne-Sophie Rigauddau^{III}

Veronica Oliveira¹

Cristina Garcia¹

Nathalie Alépée^{II}

José Cotovio^{II}

Charbel Bouez^{IV}

Introduction: In 2014, Brazil has joined the growing list of countries to ban cosmetic products from being tested on animal models. The new legislation comes into force in 2019. As a result, the interest for validated alternative testing methods for safety assessment has been increasing in academia, industry and associations. However, the lack of specific legislation on the use of biological material of human origin for toxicological tests makes the access to alternative *in vitro* models difficult. Furthermore, importation to Brazil is not possible on timely manner. **Method:** In this article, we report the implementation process of a Reconstructed Human Epidermis (SkinEthic™ RHE), an alternative model internationally accepted by OECD, through a technology transfer from EPISKIN® Lyon to Brazil. Regulatory evolution has been motivating the implementation and wide use of alternative methods to animal testing in several industry segments including cosmetic and pharmaceutical. **Results:** Protocol has been shown to be robust and highly reproducible. Quality control parameters (histological analysis, barrier function test and tissue viability) were performed on 24 batches assembled in Brazil. SkinEthic™ RHE model use allows the full replacement of animal test methods for skin hazards identification. It has regulatory acceptance for several toxicological endpoints, such as the Draize test for skin irritation and corrosion. It allows the reduction and refining of pre-clinical protocols through tiered strategies. Implementation of SkinEthic™ RHE protocol is just a first and important step towards a new approach of toxicological safety testing in Brazil. **Conclusions:** The implementation was successfully done and reported here. However, in order to follow completely the new legislation up to 2019, the availability of validated models is essential. Quality control tests done on RHE batches produced in Brazil demonstrate that the model met OECD acceptance criteria and therefore can be used for reliable prediction of irritation and corrosion classification.

KEYWORDS: Reconstructed Human Epidermis; SkinEthic™ RHE; Preclinical In Vitro Testing; Alternative Methods; Skin Irritation; Corrosion; Safety Assessment; Toxicological tests

RESUMO

Introdução: Em 2014, o Brasil aderiu à crescente lista de países a banir testes de produtos cosméticos em modelos animais. A nova legislação entra em vigor em 2019. Como resultado, o interesse em métodos de testes alternativos validados para avaliação de segurança tem aumentado na academia, indústria e associações. No entanto, a falta de legislação específica sobre o uso de material biológico de origem humana para testes toxicológicos dificulta o acesso aos modelos alternativos *in vitro*. Além disso, a importação no Brasil não é possível em tempo hábil. **Método:** Neste artigo, relatamos o processo de implementação de um modelo de Epiderme Humana Reconstruída (SkinEthic™ RHE) internacionalmente aceito pela OECD, através de uma transferência

^I L'Oréal Research and Innovation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^{II} L'Oréal Research and Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

^{III} EPISKIN, Lyon, France

^{IV} L'Oréal Research and Innovation, Clark, USA

⁶ Equally contributed to this work

* E-mail: rvecchi@rd.loreal.com

Received: October 02, 2017

Accepted: January 04, 2018



tecnológica da Episkin Lion para o Brasil, bem como discutimos a evolução regulatória que tem motivado a implementação e a ampla utilização de métodos alternativos à experimentação animal em diversos segmentos além do cosmético e farmacêutico. **Resultados:** O protocolo de fabricação dos tecidos mostrou-se robusto e altamente reprodutível, considerando os parâmetros de controle de qualidade (análise histológica, função barreira e viabilidade tecidual) analisados em 24 lotes fabricados no Brasil. **Conclusões:** A implementação do modelo SkinEthic™ RHE é apenas um primeiro e importante passo em direção a uma nova abordagem para testes de segurança toxicológica no Brasil, realizada com êxito e aqui relatada. No entanto, para seguir plenamente a nova legislação até 2019, a disponibilidade de modelos validados é essencial. Os testes de controle de qualidade realizados nos lotes RHE produzidos no Brasil demonstram que o modelo atende aos critérios de aceitação da OCDE e, portanto, pode ser usado para uma previsão confiável de irritação e classificação de compostos corrosivos.

PALAVRAS-CHAVE: Epiderme Humana Reconstruída; SkinEthic™ RHE; Testes Pré-Clínicos *in vitro*; Métodos Alternativos; Skin Irritation; Corrosion; Safety Assessment; Toxicological tests

INTRODUCTION

Since 1986, the European Union (EU) has put in place specific legislation covering the use of animals for scientific purposes. On September 2010, the EU adopted the Directive 2010/63/EU, which has updated and replaced the Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes, taking full effect on January 1st of 2013. The directive builds upon the 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) ethical framework from Russell and Burch in 1959¹, and commits to the “development, validation and uptake” of alternative methods². This directive was supported by the European Citizens’ Initiative “Stop Vivisection”, which reinforced its implementation and expanded the movement to a continental scale. Apart of Europe, US and Japan also organized government agencies responsible for the regulation and recognition of *in vitro* tests³. In 2017, this initiative was raised to the global scale. To provide a central access point, the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods developed the Integrated Chemical Environment (ICE) web resource, enabling access to high-quality reference data. ICE currently includes data about acute oral and dermal toxicity, skin irritation and sensitization, eye corrosion and endocrine disruption, as well as *in silico* predictions of test endpoints⁴.

In cosmetic industry, animal testing in the EU is prohibited for cosmetic products since 2004, and for new ingredients since 2009⁵. Replacement of the rabbit Draize skin irritation test, for example, was motivated in Europe under the REACH chemical strategy and Cosmetics Directives. Various *in vitro* protocols, including three-dimensional (3D) skin models, have been developed to overcome model limitations. Academic community and industries like L’Oréal⁶, Unilever⁷, Procter & Gamble⁸ and Henkel⁹ have collaborated to conduct interlaboratory comparisons¹⁰ and joined efforts to develop, validate and implement alternative methods in their routines, reducing the use of animal for safety assessment, with the support and acceptance of regulatory bodies. Therefore, the European Centre for the Validation of Alternative Methods (EURL ECVAM) established a list of *in vitro* validated cell-based test methods for predicting the safety and toxicity of ingredients and mixtures¹¹.

In this global taskforce, cell culture systems are essential tools used in a wide range of biomedical and clinical studies worldwide. Test methods based on 3D tissue-engineered epidermis for toxicological applications, including skin irritation and corrosion, use commercially available tissues such as EST-1000 (Cell Systems, St. Katharinen, Germany), EpiDerm™ (MatTek Corporation, Ashland, USA) and SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) (EPISKIN, Lyon, France)^{6,12,13}. Growing 3D reconstructed skin tissues approximate these models to the *in vivo* functionality, reducing the cost of drug development with an improving efficiency of preclinical trials, minimizing the failure rate in drug discovery and replacing the animal testing¹⁴. Moreover, the testing conditions are controlled and standardized, reducing the variability between experiments and project costs. With the advances in science and technology, the existing models are constantly being improved and becoming more complex, in order to reflect the interactions between cells, tissues and organs¹⁵.

SkinEthic™ RHE is a fully differentiated epithelium obtained *in vitro* on an inert polycarbonate filter substrate by culturing normal human keratinocytes (NHK) in chemically defined medium. SkinEthic™ RHE presents apparently normal multilayered epidermis, with clearly visible basal layer, spinous layer, granular layer and corneal layer. It expresses the major protein and lipid differentiation markers like keratins 1, 10, 11, involucrin, ceramides¹⁶. Taken together, the architecture and ultrastructure of the cultured epidermis resembled closely to epidermis *in vivo*. SkinEthic™ RHE test method has been adopted within the context of OECD TG 431¹⁷ for distinguishing corrosive and non-corrosive chemicals. EU classification and labelling (CLP/GHS) system requires subcategorization of corrosive chemicals into the three United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) subcategories 1A, 1B and 1C. Previous studies have demonstrated the usefulness of the validated SkinEthic™ RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories to discriminate skin corrosive UN GHS subcategories¹⁸. More recently, the pharmaceutical industry has been also following and implementing alternative methods for the research and development of drugs in Europe¹⁹ and Brazil²⁰.



The first Brazilian legislation on animal experiment has passed in 2008²¹ creating the Arouca Law, based on the controlled use of animals following the ethical doctrine of the 3R's and making sure that death by humanitarian means involves the expression "minimum physical or mental suffering". In 2012, Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication (MCTIC) officially encouraged implementation of alternative methods by inviting the National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio) and the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) to organize the National Network on Alternative Methods (Renama). Renama works alongside with Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) following the OECD GD 34²² (Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment OECD, 2005). The evolution of GD 34 involved the efforts of several international validation bodies, including BraCVAM in Brazil, responsible for identifying and receiving requests from parties interested in submitting tests for validation²³. The list of promising assays is passed to Renama, which helps with prioritization and contribution to the validation studies of the selected assays. Subsequently, a validation study is done under the supervision of BraCVAM, and the results are sent to the National Council for the Control of Animal Experimentation (Concea). Concea is in charge of registering the institutions for new validated test methods, following an open public consultation²³. In 2014, Concea has recognized the first 17 alternative methods to animal testing in Brazil, based on international officially published studies and OECD guidelines²⁴. In addition, a period of 5 years was established as a limit for the mandatory replacement of the *in vivo* method by the available alternative method, through Normative Resolution 18, based on the rules established by Normative Resolution 17. In 2016, 7 more alternative methods were recognized and recommended by Concea through the Normative Resolution 31²⁵. Timeline in the Figure 1 illustrates the recent regulatory evolution related to alternative methods in Brazil since 2008.

For decades, EPISKIN has been distributing SkinEthic™ RHE tissues worldwide, shipping it from France to several countries in Europe, Asia and Americas. Normally, RHE kits are simply classified as a laboratory reagent, compliant with ISO full traceability and guidelines such as Food and Drug Administration²⁶ for *in vitro* products

for Research Use Only (RUO). However, the lack of specific classification and agile process to release RHE kits in the customs makes importation not possible in a timely manner, as the living tissues survive around 3 days outside of the incubator.

This work presents a first possibility of how to deal with this dilemma, by implementing the OECD accepted SkinEthic™ RHE model in Brazil. We describe the quality control parameters measured on tissues fabricated in Brazil to guarantee its conformity with international defined criteria.

METHOD

SkinEthic™ RHE

SkinEthic™ RHE is an *in vitro* reconstructed human epidermis from normal human keratinocytes grown on an inert polycarbonate filter (0.5 cm²) at the air-liquid interface, in a chemically defined medium¹⁶. The cells, donated from volunteers with Consent Term, are provided from EPISKINs cell bank. Viability, barrier function and morphology are evaluated for all SkinEthic™ RHE production batches. Tissues were transferred on nutritive agarose plates and enclosed for shipment.

Chemicals

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phosphate buffered saline (D-PBS) without calcium and magnesium, Triton X-100 and paraformaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was purchased from BIO-RAD (Hercules, CA, USA). Optimum cutting temperature (OCT) compound was purchased from Sakura Finetek (Torrance, CA, USA). Hematoxylin from Ral Diagnostics (Martillac, France) and eosin from Merck KGDA (Germany).

Histology

SkinEthic™ RHE was fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, embedded in OCT and frozen in liquid nitrogen. Six-micrometer thick vertical sections were cut using a cryostat and stained with hematoxylin-eosin for histological analysis of the tissues.

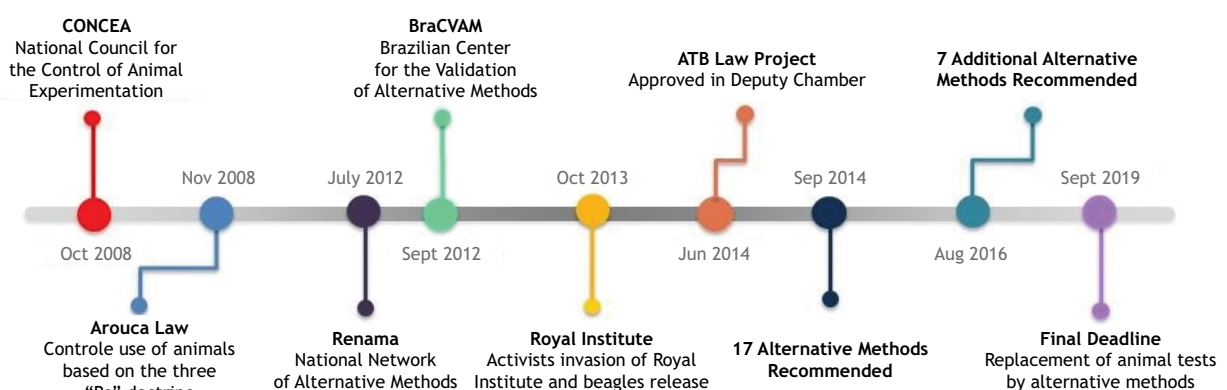


Figure 1. Regulatory evolution related to the control of animal experimentation and alternative methods recognition in Brazil. Since the creation of Concea in 2008, Brazil had significant regulatory advances and its counting down to ban animal testing for several endpoints on September 2019.



Viability test

The assay used for quantifying tissue viability was the MTT-assay. The mitochondrial dehydrogenase activity of the viable cells of the SkinEthic™ RHE tissues construct reduces the vital yellow dye of the MTT into a blue formazan precipitate²⁷, which is then extracted from the tissues using isopropanol.

Tissues were transferred into a 24-well plates containing 0.3 mL of 0.5 mg/mL MTT solution and incubated for 3 h at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. After 3 h incubation, the tissues were placed in 1500 µL of isopropanol at room temperature for 2 h. Viability was measured on 24 independent productions, using always a minimum of two tissues per production. Optical density (OD) was measured by adding a three technical replicates of 200 µL of each sample into 96 flat bottom well plates for measuring the absorbance at 570 nm. The OD of the extraction solvent alone was small, i.e., OD < 0.1 for each batch of the tested RHE. Acceptability limit of OD ≥ 0.7 for viable tissues on day 17 of differentiation was established, according to EPISKIN France historical database.

Barrier Function

The barrier function property of the tissue was estimated by the exposure time required to reduce relative cell viability by 50% (ET-50) upon application of 1% Triton X-100. Three time points were used: 6, 4 and 2.5 h. For each condition we utilized 3 tissues, including control group, which was treated with water instead of Triton X-100. After treatment, the tissues were transferred into a 24-well plates containing 0.3 mL of 0.33 mg/mL MTT solution and incubated for 3 hours at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. After 3 hours of incubation, the tissues were placed in 1500 µL of isopropanol at room temperature overnight. OD was measured by adding a triplicate of 200 µL of each sample into 96 flat bottom well plates for measuring the absorbance at 570 nm. Viability of Triton X-100 treated tissue at different time points was compared to the concurrent negative control tissues. An acceptability range (upper and lower limit) for the ET-50 Triton X-100 has been established in OECD test guidelines 439²⁸ and 431¹⁷ ranging from 4 to 10 hours.

Irritation test

Irritation test was done using proficiency chemicals recommended in OECD test guidelines 439. We tested five non-irritant and four irritant substances, including liquids and solids. SDS 5% was used as reference irritant (positive control) and PBS (without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺) served as negative control (NC), in each series of experiments. SD value is considered as valid if it is ≤18%. Positive control data meets the acceptance criteria if the mean viability, expressed as % of the NC, is < 40% and the standard deviation (SD) value is ≤18%.

RHE tissues were topically exposed to undiluted liquids (16 ± 0.5 µl) or solids (16 ± 2 mg) for 42 min, at room temperature. Prior applying solids, 10 ± 0.5 µl of distilled water was spread on the whole surface of RHE tissues. A nylon mesh (EPISKIN, France) was applied onto the test substance as spreading support for all liquid and viscous test substances. RHE tissues were then rinsed 25 times, with 1 mL each, of sterile PBS without calcium and magnesium. Treated tissues were

incubated for 42 h at 37°C, 5% CO₂, with 2 mL of growth medium. Cytotoxicity was determined by measuring the dehydrogenase activity of viable RHE tissues following a 42 h post-incubation. Each experiment was performed at least in triplicate of one tissue production batch. Each substance was tested on reconstructed tissues of three different cell batches.

After subtracting the blank OD from all raw data, mean OD values ± SD were calculated using nine measurements per test substance (three RHE tissues, three replicates/tissue) and the percentage of cell viability was expressed relatively to negative control as following: 100 x mean OD_{treated} / mean OD_{control}. Negative control value was set at 100%. For further details, please refer to OECD test guidelines 439.

RESULTS

RHE models were produced following rigorously the same quality specifications as the original tissues produced in EPISKIN Lyon, France. In order to confirm the reproducibility and robustness of the protocol in Brazil, viability, barrier function and histology were evaluated on each SkinEthic™ RHE batch generated. In this study, 24 independent productions were carried out, with 4 different primary keratinocytes cell batches. Quality controls were conducted in different stages of differentiation, and included histology, barrier function, and viability. A SkinEthic™ RHE tissue batch was considered as normal histologically if at least four viable layers of cells were present. Tissues histology analyzed during the second, third and fourth week of differentiation are shown on Figure 2. In the second week of protocol, the tissue is still not fully differentiated, however, at least 4 layers of live cells are already present and well organized with a very thin

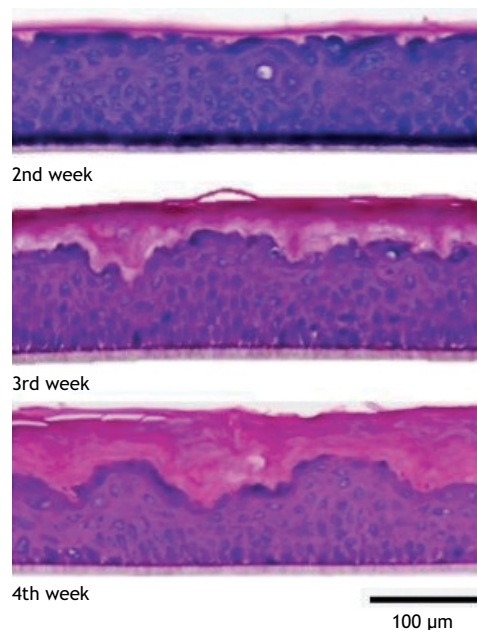


Figure 2. Histology of SkinEthic™ RHE using Hematoxylin/Eosin staining of one representative batch during 2nd, 3rd and 4th week of differentiation *in vitro*. Scale bar: 100 µm.



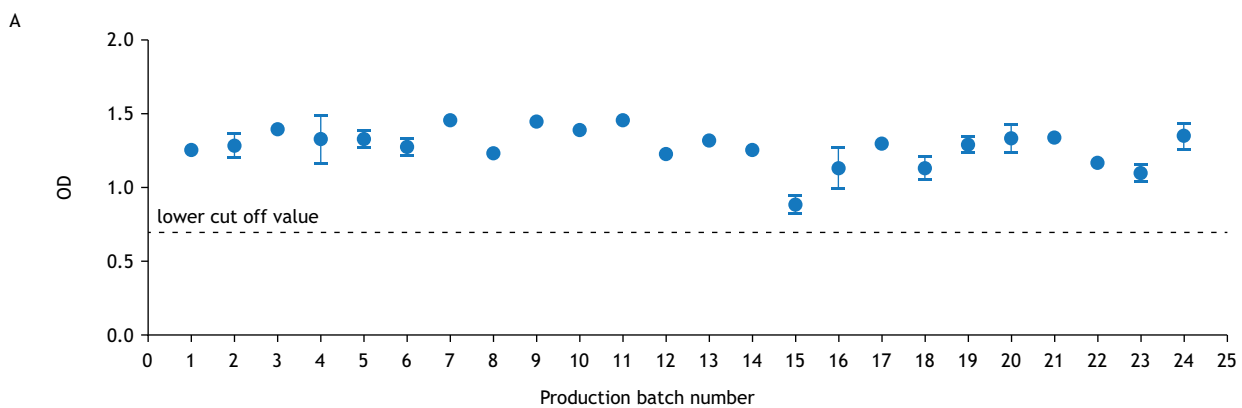
corneal layer. On the third week in culture, the tissue is fully-differentiated, consisting of basal layer, *stratum spinosum*, granular layer and multilayered *stratum corneum*. If we maintain the RHE for one additional week, the organization of tissue is preserved with increased corneal layer thickness. No histological alterations were observed in the experiments.

The MTT assay was used to measure cell viability. Mean OD value for 24 production batches (independent experiments) is 1.278 ± 0.050 , having minimum of two tissues per production. Figure 3 demonstrates the reproducibility of the production batches over time. All batches generated in Brazil had the mean OD values above 0.7, which is the threshold acceptance limit established in OECD TG 431 and 439. The OD of the

extraction solvent alone was minimal, i.e., $OD < 0.1$ for each batch of the SkinEthic™ RHE production.

Barrier function tests showed that batches generated in Brazil are in conformity with OECD Test Guidelines 431¹⁷ and 439²⁸ standards. Values of ET-50 were inside the acceptability range, ranging from 4 to 10 h, for all produced batches. Mean value of 19 batches was 7.33 ± 1.45 h (Figure 4). This result prove that the RHE produces a functional barrier with robustness to resist rapid penetration of Triton X-100 to the viable tissue.

All chemicals from the proficiency list were well classified using the MTT endpoint. After the treatment with the group of non-irritants (NI) viability was always higher than 50% and after the treatment with irritants (I) always lower than 50% (Figure 5).



B

Production*	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Mean	1.250	1.284	1.395	1.326	1.328	1.275	1.456	1.230	1.451	1.392	1.458	1.229	1.315	1.249	0.888	1.130	1.300	1.136	1.293	1.329	1.338	1.166	1.096	1.346
SD	0.031	0.083	0.018	0.166	0.064	0.062	0.020	0.007	0.027	0.036	0.006	0.007	0.028	0.018	0.060	0.144	0.031	0.075	0.047	0.101	0.009	0.010	0.053	0.089

Figure 3. (A) Graph showing average ODs of tissue viability test (MTT) of 24 batches generated in Brazil, showing a high repeatability and reproducibility. Dots represent mean OD of two tissues from the same production. (B) Table with the mean and standard deviation values corresponding to graph A.

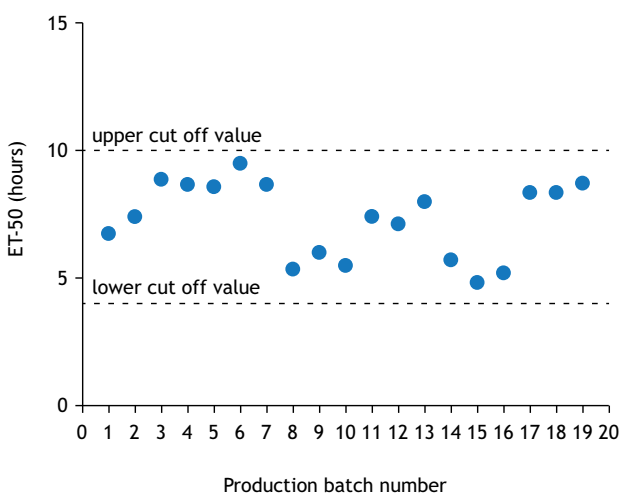


Figure 4. ET-50 values for 19 batches generated in Brazil, showing a high repeatability and reproducibility.

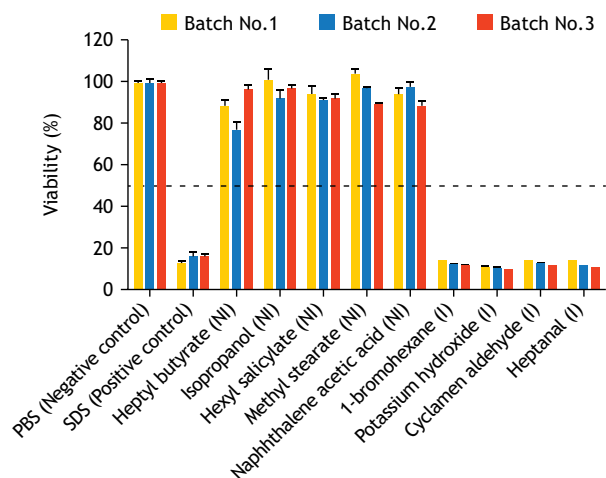


Figure 5. Cell viability after treatment with proficiency chemicals suggested in the OECD test guideline 439. Each substance was tested on RHE tissues reconstructed from three different cell batches. Bar represents mean with SEM.



DISCUSSION

The availability of validated alternative test methods depends on robust and reproducible protocols for testing systems, such as the Reconstructed Human Epidermis (RHE) model. These models have been recognized as technical foundation for scientific community and several industrial segments to maintain international competitiveness of Brazilian research, innovation and development activities.

Several human skin models use cultured primary cells or immortalized cell lines to produce artificially reconstituted 3D skin multilayered tissues²⁹. These tissues, also known as Reconstructed Human Epidermal models, like SkinEthic™ RHE, EpiDerm and others, are commercially available and show reasonable similarities to the human skin in terms of morphology, lipid composition and biochemical markers. Although are not human skin fragments, these models are useful testing tools for safety assessment of new compounds for phototoxicity, corrosivity and irritancy, so several test protocols have been developed for toxicological and pharmacological evaluation³⁰. For instance, recent versions of the OECD guidelines for skin irritation (TG 439) and skin corrosion (TG 431) have been released and internationally accepted⁶.

Here we report the successful implementation of validated SkinEthic™ RHE model in Brazil. This RHE model is in conformity with EPISKIN global standards, based on evaluation of quality control parameters such as histology, barrier function and viability tests. Results presented here (Figures 2, 3, 4 and 5) confirm the robustness of SkinEthic™ RHE model and its high reproducibility. Considering results obtained with several RHE batches made in Brazil, following strictly the original production protocol practiced in France for decades, there was no need of formal re-validation. Test methods using SkinEthic™ reconstructed epithelia, mainly for irritation and corrosion, have been internationally validated and accepted by OECD member countries^{28,17,31} (OECD Test Guidelines TG 439, 431, 492).

Recent regulatory advances in Brazil are not followed by legislative adaptations. The current law does not specify the distribution of engineered tissues, as it dates from 1988³² (the Article 199, § 4 of the Brazilian Federal Constitution). By that time, the scientific advances from the last decades could not be foreseen, as well as the importance of alternative methods availability to the national industrial demand for research, development and innovation in a banning scenario. By not specifying engineered tissues, the Article 199 makes the availability and distribution of RHE tissues uncertain in the country, due to eventual misinterpretations of its paragraph 4.

Therefore, the absence of a specific framework in Brazil to confer legal safety for the wide use and availability of alternative methods, such as SkinEthic™ RHE model, is still one of the factors that hinder the development of this technology in the country and need to be clarified by legislators. On the other hand, the recognition of the 24 methods by Concea, covering 11 endpoints including 5 of which RHE model is useful and internationally recognized contributing to the reduction, replacement and refining

of animal use in research activities and preclinical toxicological tests. However, the access, availability and deployment of alternative methods are still limited by the referred paragraph of Brazilian Constitution, dated from 1988³². Almost 30 years ago, it could not preview the coming scientific advances in the country and the importance of alternative methods availability to supply the industrial demand in the current banning scenario of nowadays. Thus, the referred article is not applied in the case of RHE, as it states specifically on the conditions and requirements for the removal, collection and processing of organs, tissues and human substances for transplant, research and treatment.

Although human epithelia artificially reconstructed *in vitro* do not record in these legal articles, RHE cannot be classified as human tissue or organ, once they are not removed or developed by the human body, but generated in laboratory from human epidermal keratinocyte cultures, which are legally imported and freely commercialized in the Brazilian territory. Furthermore, SkinEthic™ RHE model is structurally constituted of single cell type, which grows in a multilayered cell culture with air-liquid interface, differentiate and allows the formation of the *stratum corneum* mimicking the human skin barrier. The reproducibility of this reconstruction process, internationally accepted and recommended by several OECD test guidelines, is only possible following a specific and extensively manipulated protocol, developed and validated along decades, where the cells are plated on the polycarbonate insert, embedded in a chemically defined medium.

Besides its functional similarity with the human epidermis, which is only the most external layer of human skin, there is a consensus that RHE does not fit to the constitutional article 199 paragraphs since it is constituted of extensively manipulated cells, entirely generated in laboratory. These multilayered cell cultures present biochemical and morphological features that distinguish them from human tissues and organs, so they cannot be classified as human tissues or organs. This interpretation was confirmed in a Legal Advice n. 01/2017 issued by CGREG/Direg/Anvisa stating that RHE is a Research Use Only (ROU) product, exempt of Anvisa surveillance and control, according to the exception established in the Article 2°, subsection VIII of the Resolution RDC n° 36/2015³³. Moreover, RHE model is a useful tool to replace animal testing methods, such as Draize *in vivo* rabbit irritation test¹³, resulting data is internationally accepted by OECD. In Brazil, the use and implementation of validated alternative methods is recognized and recommended by Concea, and supported by Renama and MCTIC³⁴.

CONCLUSIONS

Implementation of the validated SkinEthic™ RHE model in Brazil opens the possibility of assessing several toxicological endpoints, from skin irritation and corrosion to other endpoints, such as skin sensitization, skin penetration, phototoxicity and genotoxicity. *In vitro* reconstructed human epithelia models reproduce the main features of human *in vivo* tissues. Their robustness, reproducibility and proximity to targeted human tissues makes it possible to overcome the animal testing, to



build *in vitro* screening architectures and predictive assessment of the effects in humans. Moreover, they have evidenced time and cost savings. For all these reasons, *in vitro* reconstructed human tissue models are massively used worldwide for safety and efficacy screening. Implementing OECD accepted alternative models in Brazil is one of the most effective ways to promote the implementation of alternative methods before the complete banning in 2019. Brazilian legislation on the use of biological materials of human origin makes *in vitro* epidermis model inaccessible to wide use. In order to implement

completely the new legislation up to 2019, the availability of *in vitro* models is essential. Therefore, specific public documents conferring its legal safety are of great relevance to the country. Quality control tests done on RHE batches produced in Brazil show that the model met OECD acceptance criteria and therefore can be used for reliable prediction of irritation and corrosion classification. Quality control tests done on RHE batches produced in Brazil show that the model met OECD acceptance criteria and that therefore can be used for reliable prediction of irritation and corrosion classification.

REFERENCES

1. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare; 1992.
2. Germain, P, Chiapperino, L, Testa, G. The European politics of animal experimentation: from Victorian Britain to 'Stop Vivisection'. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2017;64:75-87. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2017.06.004>
3. Araújo GL, Campos MA, Valente MA, Silva SC, França FD, Chaves MM et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz J Pharm Sci.* 2014;50(1):55-62. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
4. Bell SM, Phillips J, Sedykh A, Tandon A, Sprankle C, Morefield SQ et al. An integrated chemical environment to support 21st-Century toxicology. *Environ Health Perspect.* 2017;125(5):054501. <https://doi.org/10.1289/EHP1759>
5. Almeida A, Sarmento B, Rodrigues F. Insights on *in vitro* models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *Int J Pharm.* 2017;519(1-2):178-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.024>
6. Alépée N, Grandidier MH, Tornier C, Cotovio J. An integrated testing strategy for *in vitro* skin corrosion and irritation assessment using SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(7):1779-92. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.012>
7. Basketter DA, Whittle E, Chamberlain M. Identification of irritation and corrosion hazards to skin: an alternative strategy to animal testing. *Food Chem Toxicol.* 1994;32(6):539-42. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90111-2)
8. Robinson MK, Cohen C, Fraissinette AB, Ponc M, Whittle E, Fentem JH. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(5):573-92. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00005-4)
9. Mewes KR, Fischer A, Zöller NN, Laubach V, Bernd A, Jacobs A et al. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I). *Toxicol In Vitro.* 2016;36:238-53. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.007>
10. Reus AA, Reisinger K, Downs TR, Carr GJ, Zeller A, Corvi R et al. Comet assay in reconstructed 3D human epidermal skin models—investigation of intra- and inter-laboratory reproducibility with coded chemicals. *Mutagenesis.* 2013;28(6):709-20. <https://doi.org/10.1093/mutage/get051>
11. European Parliament. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010. Protection of animals used for scientific purposes. Official J European Union. 2010 Oct 20.
12. Groeber F, Schober L, Schmid FF, Traube A, Kolbus-Hernandez S, Daton K et al. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicol In Vitro.* 2016;36:254-61. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.007>
13. Lee M, Hwang JH, Lim KM. Alternatives to *In vivo* draize rabbit eye and skin irritation Tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. *Toxicol Res.* 2017;33(3):191-203. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.3.191>
14. Amelian A, Wasilewska K, Megias D, Winnicka K. Application of standard cell cultures and 3D *in vitro* tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacol Rep.* 2017;69(5):861-70. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>
15. Vries RB, Leenaars M, Tra J, Huijbregtse R, Bongers E, Jansen JA et al. The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(7):771-8. <https://doi.org/10.1002/term.1703>
16. Rosdy M, Clauss LC. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 1990;95(4):409-14. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12555510>
17. OECD Library. *In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: OECD; 2016. (OECD Guideline for the testing of chemicals, Vol. 431).
18. Alépée N, Robert C, Tornier C, Cotovio J. The usefulness of the validated SkinEthic™ RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(4):616-25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.013>
19. Goh JY, Weaver RJ, Dixxon L, Platt NJ, Roberts RA. Development and use of *in vitro* alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980-2013. *Toxicol Res (Camb).* 2015;4(5):1297-307. <https://doi.org/10.1039/C5TX00123D>



20. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
21. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras*. 2009;24(1):69-74. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000100015>
22. OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. Paris: OECD; 2005. (OECD Series on testing and assessment, Vol. 34).
23. Presgrave O, Moura W, Caldeira C, Pereira E, Bôas MH, Eskes C. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil. *Altern Lab Anim*. 2016;4(1):85-90.
24. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 2014 set 25.
25. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. *Diário Oficial União*. 2016 ago 19.
26. U.S. Department of Health and Human Service. Food and Drug Administration - FDA. Distribution of in vitro diagnostic products labeled for research use only or investigational use only: guidance for industry and food and drug administration staff. Silver Spring: Center for Biologics Evaluation and Research; 2013.
27. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16;65(1-2):55-63, 1983.
28. OECD. *In vitro* skin irritation reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: OECD; 2015. (OECD Guideline for the testing of chemicals, Vol. 439).
29. Hewitt NJ, Edwards RJ, Fritsche E, Goebel C, Aeby P, Scheel J et al. Use of human in vitro skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Toxicol Sci*. 2013;133(2):209-17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft080>
30. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;60(2):167-78. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>
31. OECD. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage Paris: OECD; 2015. (OECD Guideline for the testing of chemicals, Vol. 492).
32. Senado Federal (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal. 1988.
33. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução - RDC Nº 36, de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico in vitro, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 27 ago 2015.
34. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (BR). Portaria Administrativa Nº 3.856, 2017. *Diário Oficial União*. 12 set 2017.

Conflict of Interest

The authors are employees of L'Oréal Research & Innovation and EPISKIN.



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.

Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o *in vitro* do *in vivo*

Three-dimensional cell culture: nearing the gap between *in vitro* and *in vivo* models

Marianna Cavalheiro^{I,III}

Ana Paula D N de Barros^{II,III}

Rafaela de A Louback^{II,III}

Maria Isabel D Rossi^{II,III}

RESUMO

Introdução: Os avanços biotecnológicos em associação com a pressão para substituir a experimentação animal impulsionam o desenvolvimento de modelos *in vitro* mais fisiológicos e preditivos da resposta *in vivo*. **Objetivo:** Discutir vantagens e limitações de modelos tridimensionais (3D) de cultura de células. **Método:** Revisão da literatura na base PubMed utilizando os termos “3D culture”, *spheroid*, *organoid*, “*organotypic culture*”, “*alternative model*”, *microfluidic*, *organ-on-a-chip* e *biotechnology*, individualmente e em diferentes combinações. A pesquisa abrangeu o período de 1971 a 2017. **Resultados:** Ensaios tradicionais de cultura em monocamada, embora sejam amplamente utilizados, não reproduzem as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, que criam gradientes físicos e químicos e controlam funções celulares, como sobrevivência, proliferação, diferenciação, migração e expressão de genes e proteínas. Modelos 3D de cultura de células são capazes de mimetizar um microambiente mais fisiológico. O número de publicações no período estudado reflete o crescente interesse científico no tema. **Conclusões:** Embora os modelos 3D tenham inequivocamente contribuído para as áreas de bioengenharia, morfogênese, oncologia e toxicologia, muitos desafios permanecem. O custo elevado de alguns destes modelos, reproduzir as características mecânicas, espaciais e temporais dos tecidos, assim como a necessidade de desenvolver protocolos padronizados devem ser considerados.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura 3D; Modelo Alternativo; Esferoide Multicelular; Cultura Organotípica; Organóide

ABSTRACT

Introduction: Biotechnological advances in association with the pressure to substitute animal experimentation impelled the development of *in vitro* models that are more physiological and predictive of *in vivo* response. **Objective:** To discuss advantages and limitations of three-dimensional (3D) cell culture models. **Method:** Review of the scientific literature at PubMed using the keywords “3D culture”, *spheroid*, *organoid*, “*organotypic culture*”, “*alternative model*”, *microfluidic*, *organ-on-a-chip* and *biotechnology*, individually and in different combinations. The search period was from 1971 to 2017. **Results:** Traditional monolayer cell culture assays, although extensively used, do not reproduce the cell-cell and cell-extracellular matrix interactions that create physical and chemical gradients and that control cell functions, such as survival, proliferation, differentiation, migration, and protein and gene expression. 3D cell culture models are able to mimic more physiological microenvironment. The number of manuscripts published in this period reflects the scientific interest in the field. **Conclusions:** Although 3D models have unequivocally contributed to the bioengineering, morphogenesis, oncology, and toxicology fields, many challenges remain. The high cost of some of these models, to reproduce the mechanical spatiotemporal features of the tissues, as well as the lack of standard protocols should be taken into account. Here we discuss the advantages and limitations of some 3D cell culture models.

KEYWORDS: 3D Culture; Alternative Model; Multicellular Spheroid; Organotypic Culture; Organoid

^I Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, RJ, Brasil

^{II} Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: idrossi@hucff.ufrj.br

Recebido: 30 set 2017

Aceito: 23 jan 2018



INTRODUÇÃO

Desde a última década do século XX até hoje, o avanço tecnológico na área da biologia e da saúde foi imenso. Foram criadas ferramentas e metodologias que possibilitam a manipulação de moléculas de DNA e RNA e o desenvolvimento *in vitro* de tecidos e órgãos com características semelhantes às observadas *in vivo*. A capacidade de sequenciar o genoma de maneira rápida e eficiente foi grandemente ampliada desde 1995, ano da primeira publicação científica no tema, até 2001, quando os primeiros resultados do projeto genoma humano foram publicados^{1,2}. Concomitantemente, o conhecimento adquirido nas últimas décadas sobre células-tronco derivadas da camada interna de blastocistos (células-tronco embrionárias), de tecidos adultos e as de pluripotência induzida (iPSC - *induced Pluripotent Stem Cell*) tem trazido um avanço considerável na área da Medicina Regenerativa, que inclui a terapia celular e a bioengenharia^{3,4,5,6,7,8}, com 6.205 ensaios clínicos utilizando células-tronco registrados até o momento (Fonte: <https://clinicaltrials.gov>). Ou seja, a área de Biotecnologia, definida como “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica”, pelo art. 2º do texto aprovado na Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (Rio de Janeiro, 5 a 14 de junho de 1992) e aprovado pelo Decreto Legislativo nº 2 de 1994, tem se expandido continuamente. Sem dúvida, a biotecnologia abre enormes possibilidades, como criação de organismos sintéticos^{9,10} e mudança na forma de lidar com patologias causadas por mutações genéticas^{11,12}. No entanto, é inquestionável que seu provável avanço nos próximos anos cria desafios éticos e regulatórios, que já vem sendo debatidos em países desenvolvidos^{11,13,14}.

No Brasil, o debate avança de forma mais lenta para a aprovação de terapias celulares e comercialização de tecidos engenheirados a partir de células humanas. A polêmica da comercialização recai sobre § 4º do art. 199 da Constituição Federal que, apesar de aprovar a “remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas” incluindo a “coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados”, restringe essas práticas a “fins de transplante, pesquisa e tratamento” vetando “todo tipo de comercialização”¹⁵. A legislação brasileira vigente ainda possui dispositivos como a Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997 e a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 (Lei de Biossegurança), que dispõem, respectivamente, sobre a disposição gratuita de órgãos, tecidos ou partes do organismo e sobre a normativa de segurança e fiscalização das atividades que envolvam organismos geneticamente modificados (OGMs)^{16,17}. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) vem avançando, de forma discreta, no desenvolvimento de diretrizes mais significativas na área. É o caso da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) no 9, de 14 de março de 2011 que: “Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia”¹⁸. Esta questão, por requerer um fórum específico, embora urgente e necessária, não será abordada mais amplamente neste espaço.

Novos produtos biotecnológicos na área da saúde requerem plataformas ou modelos que permitam avaliar sua eficácia e segurança

antes de sua aplicação em testes clínicos. Em geral, os testes pré-clínicos envolvem modelos *in vitro* com cultura de células em monocamada, na sua maioria de linhagens celulares imortalizadas e comercialmente disponíveis, e modelos *in vivo*. Os testes *in vivo*, que utilizam animais de laboratório, são frequentemente inadequados em função de diferenças espécie-específicas. Além disso, como consequência da preocupação quanto à utilização de animais como modelo experimental, a política de substituição, redução e refinamento, denominada de política dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*), foi introduzida na década de 1950. No Reino Unido, o *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs - www.nc3rs.org.uk) foi criado tendo como missão encontrar soluções inovadoras para atingir os objetivos da política dos 3Rs, o que também impulsionou o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais^{19,20}. O próprio avanço biotecnológico é propulsor do desenvolvimento de modelos alternativos reprodutíveis, mais próximos da biologia humana e, conseqüentemente, com maior poder preditivo.

Objetivou-se apresentar diversos tipos de modelos de cultivo tridimensional numa perspectiva histórica e discutir criticamente vantagens e limitações destes quanto ao seu poder preditivo e reprodutibilidade para implantação como alternativa ao uso de animais de experimentação. Em função da vasta literatura, não se pretendeu esgotar o assunto e, assim, informação complementar foi indicada.

MÉTODO

Aqui apresentamos uma revisão narrativa da literatura sobre modelos de cultura tridimensional, sem esgotar o tema, dada a vastidão de artigos no assunto, o que reflete o grande interesse científico atual na área. O levantamento da literatura foi realizado através de consulta a base de dados PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), utilizando as expressões: “3D culture”, *spheroid*, *organoid*, “*organotypic culture*”, “*alternative model*”, *microfluidic*, *organ-on-a-chip* e *biotechnology*, individualmente e em diferentes combinações, tais como: (a) “3D culture” OR *spheroid*; (b) “3D culture” AND “*alternative model*” e (c) “3D culture” AND *biotechnology*. A pesquisa abrangeu o período de 1971 a 2017 e os artigos foram selecionados por sua importância histórica e científica, levando-se em consideração, ainda, sua disponibilidade no portal Capes (www.periodicos.capes.gov.br) ou livre acesso. Dado o número de publicações no assunto (total de 5.497 no período determinado, utilizando apenas as palavras-chave *spheroid* ou “3D culture”), foram selecionados artigos de revisão como fonte de consulta complementar. Informações complementares sobre biotecnologia foram obtidas na página do governo brasileiro com acervo de leis federais e a Constituição de 1988 (<http://www4.planalto.gov.br/legislacao>). Além disto, a página do NC3Rs (www.nc3rs.org.uk) foi consultada sobre a política de redução, substituição e refinamento do uso de animais em experimentação.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelos de cultura de células animais bidimensionais e tridimensionais: histórico

Culturas de células animais foram introduzidas no início do século XX como método de estudo e, após o isolamento da primeira linhagem de células tumorais humanas, as células HeLa, na década de 1950, foram crescentemente utilizadas^{21,22}. Embora esta técnica tenha permitido inegáveis avanços na área de biologia celular e ainda seja amplamente utilizada, a partir do final do século XX e início do XXI, as limitações do modelo, em especial no que diz respeito a testes de novos fármacos, se tornaram evidentes. Numa cultura tradicional, em geral denominada de cultura bidimensional (2D), as células tendem a formar uma monocamada aderida a uma superfície de poliestireno modificado para favorecer a adesão, o que é obviamente um substrato não encontrado *in vivo* e que induz uma polarização artificial das células, não observada quando estas estão nos tecidos. *In vivo*, as células interagem entre si através de moléculas de adesão, principalmente da família das caderinas, e de complexos juncionais (desmossomos, junção íntima ou oclusiva e junção de adesão) que se ligam, na sua porção citoplasmática, a proteínas do citoesqueleto, através de moléculas adaptadoras^{23,24,25,26}. Além disso, dependendo do tipo, as células se encontram: (a) imersas numa matriz extracelular de composição variada, que inclui diversos tipos de colágeno, fibras elásticas, diversas glicoproteínas, como fibronectina, laminina e vitronectina, além de proteoglicanos e glicosaminoglicanos ou (b) apoiadas numa lâmina basal formada predominantemente por laminina, além de colágeno IV e proteoglicanos. As células ligam-se à matriz extracelular via moléculas principalmente do tipo integrina, que também interagem, através de moléculas adaptadoras, ao citoesqueleto^{27,28,29}. Estas interações célula-célula e célula-matriz extracelular criam forças mecânicas que organizam espacialmente tanto a matriz extracelular quanto os componentes celulares (citoesqueleto e organelas), modulando diversas propriedades celulares, como forma, diferenciação e migração^{26,30,31,32,33,34,35,36}. Associadas a gradientes químicos gerados por difusão de fluidos, O₂ e metabólitos celulares^{37,38,39,40}, e pela associação de fatores de crescimento e quimiocinas a moléculas da matriz extracelular^{27,41} estas interações formam microambientes específicos, ou nichos, que regulam a homeostasia dos tecidos^{42,43,44,45}. Tanto as interações celulares complexas quanto os gradientes físicos e químicos observados nos tecidos não são reproduzidos nas culturas em monocamada sobre plástico^{33,40,46,47,48,49,50,51,52,53,54}. Além disso, possivelmente como resultado de sua adaptação às condições de cultura em monocamada, as células modificam o padrão de expressão gênica^{49,51,54,55,56}. Portanto, não é surpreendente que, dependendo dos objetivos do estudo, os resultados observados com estes modelos *in vitro* muito frequentemente não sejam reproduzidos *in vivo*. De fato, os resultados instigantes do grupo da Dra. Mina Bissell^{57,58}, obtidos a partir de cultivo de células em sistema tridimensional (3D), mudaram o panorama na área de oncologia, merecendo um editorial na revista *Nature* intitulado “*Goodbye flat biology?*”⁵⁹ e o lançamento, pelo Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos (NIC - *National Cancer Institute*), de um programa de pesquisa, iniciado em outubro de 2003, com

orçamento anual de US\$ 400 milhões para modelos de cultura 3D⁶⁰. Isto impulsionou o desenvolvimento de sistemas *in vitro* que buscam mimetizar a fisiologia e a histologia de órgãos e tecidos humanos, o que é refletido pelo aumento no número de publicações científicas sobre o assunto desde então⁵¹. Um levantamento no portal PubMed, utilizando os termos “*3D culture*” OR *spheroid* resultou em 5.497 artigos publicados no período de 1971 a 2017. A análise ao longo do tempo indicou um grande aumento no número de artigos publicados a partir do início do século XX. De 1971 até 2000, a média foi de 37 artigos ao ano, passando para 261 artigos ao ano a partir de 2001. Somente em 2017 foram publicados 936 artigos, o que comprova o interesse no assunto e o impacto dos resultados obtidos com modelos *in vitro* tridimensionais.

Tipos de modelos de cultivo 3D

Diversos sistemas de cultura, que propõem uma abordagem onde uma organização mais fisiológica, complexa e tridimensional das células ocorra, têm sido desenvolvidos, desde os primeiros relatos em 1971. Técnicas, denominadas de cultura 3D, culturas organotípicas ou culturas de organoides, incluem sistemas onde as células são cultivadas em moldes tridimensionais de composição variável, modelos em que células ou fragmentos de órgãos são mecanicamente sustentados (Figura 1) e modelos de agregados em suspensão, denominados esferoides por seu aspecto arredondado (Figura 2). Mais recentemente, sistemas microfabricados de cultura microfluidica (*microfluidics culture*) e os denominados de órgãos sobre chip (*organ-on-a-chip*) foram introduzidos.

Cultivo em moldes de biopolímeros, cerâmica ou metal

Os modelos que utilizam moldes procuram criar um ambiente que mimetize a matriz extracelular e, conseqüentemente, regule a organização espacial das células, sua migração, proliferação e diferenciação. Uma grande diversidade de substâncias, como moléculas de matriz extracelular, biopolímeros naturais, polímeros sintéticos ou híbridos, cerâmicas e metais, tem sido utilizada como molde^{49,51,53,61,62,63,64}. Os diversos biomateriais variam na sua rigidez, porosidade e potencial biodegradável e a escolha do material depende tanto do tipo celular, quanto da aplicação do estudo. Fatores de crescimento podem ser incorporados, favorecendo a proliferação e a diferenciação das células cultivadas nestes moldes e tornando-os mais fisiológicos, ou seja, mais similares à matriz extracelular dos tecidos. A variedade de biomateriais e suas aplicações são objetos de revisões específicas^{49,51,53,63,64}.

Os sistemas com matriz extracelular ou biopolímeros foram inicialmente propostos com o cultivo de células primárias (obtidas por dissociação de tecidos *ex vivo*) ou linhagem estabelecida, em suspensão ou como agregados, sobre substrato de matriz extracelular, o que não constitui propriamente uma cultura 3D (Figura 1A). Ainda assim, verificou-se que este tipo de cultura favoreceu a proliferação e a diferenciação das células, permitindo que estas se associassem de forma mais fisiológica, mimetizando sua organização *in vivo*. Estes estudos contribuíram para o entendimento do impacto das interações célula-matriz extracelular nas propriedades celulares e como estas eram modificadas dependendo do tipo de substrato^{49,63,64,65,66,68}.



Na tentativa de reconstituir um ambiente mais fisiológico, as células foram encapsuladas na matriz polimerizada, que forma um gel (Figura 1B). Neste ambiente tridimensional, em contato com moléculas da matriz extracelular, diferentes tipos celulares (tumoriais e fibroblastos, entre outras) foram capazes de migrar de forma muito semelhante ao observado *in vivo*, o que possibilitou investigar os detalhes da interação célula-matriz durante a migração^{69,70}. Além disso, estes modelos permitem que as células se organizem de forma complexa. Por exemplo, células derivadas de glândulas mamárias formam estruturas semelhantes a dutos ramificados ou a ácinos^{71,72} (Figura 1C-D). Ou seja, num ambiente 3D, as células organizam-se espontaneamente formando estruturas histológicas complexas, que se assemelham às observadas nos órgãos dos quais derivam. Por este motivo, estas estruturas foram denominadas de organoides (*oides*, do latim, significa semelhante). No entanto, alguns grupos de cientistas restringem o termo organoide a modelos 3D iniciados com células-tronco ou progenitores, que proliferam e se diferenciam, gerando uma progênie que forma estruturas histológicas semelhante à dos órgãos de origem^{63,73,74}. Organoides de intestino (*mini-guts*) foram descritos em 2009 a partir de células com potencial de célula-tronco, isoladas das criptas do intestino delgado, que foram cultivadas em modelo 3D de matrigel. O sistema permitiu a proliferação e a diferenciação destas células que originaram as demais populações do epitélio intestinal (enterócitos, células caliciformes e células de Paneth) e formaram estruturas semelhantes às criptas e vilosidades intestinais^{75,76}. Ou seja, o modelo foi capaz de revelar o potencial de diferenciação das células-alvo, confirmando sua identidade como célula-tronco intestinal. Organoides de cérebro

(*mini-brains*) foram desenvolvidos a partir de uma adaptação do modelo de indução de neuroectoderma em corpos embrionários formados por células-tronco embrionárias⁷⁷. Além de possibilitar a compreensão da morfogênese do tecido nervoso, estes organoides mostraram-se uma ferramenta importante na descrição de mecanismo patológico do vírus Zika e sua possível implicação no desenvolvimento de microcefalia⁷⁸. Os exemplos acima mostram as potenciais aplicações deste sistema de cultura na compreensão da morfogênese dos tecidos e na modelagem de doenças e, portanto, não é de se estranhar que uma lista crescente de outros modelos, como de fígado, retina, pituitária, pulmão, pode ser encontrada na literatura científica^{63,73,74,79}.

Modelos de cultura 3D mecanicamente sustentados

Culturas de órgãos e fragmentos de tecido foram introduzidas em meados do século XX e, como as condições de difusão de nutrientes e trocas gasosas não são ideais se os tecidos ficam imersos em meio líquido, as estratégias de cultura foram orientadas no sentido de favorecer estes processos. Assim, as culturas de órgãos utilizam um suporte que permite que os tecidos fiquem numa interface líquido-ar (Figura 1E). Inicialmente, os suportes foram montados com filtro microporoso aplicado sobre grade de metal, gel de colágeno ou esponja, mas, recentemente, insertos com membrana porosa, disponíveis comercialmente, são os suportes mais utilizados^{21,63,80,81}. Este tipo de cultura mantém as características histológicas dos tecidos e trouxe avanços em várias áreas do conhecimento. Entre os vários tipos de cultura de órgãos, o modelo de cultura de timo fetal (FTOC, *fetal thymus*

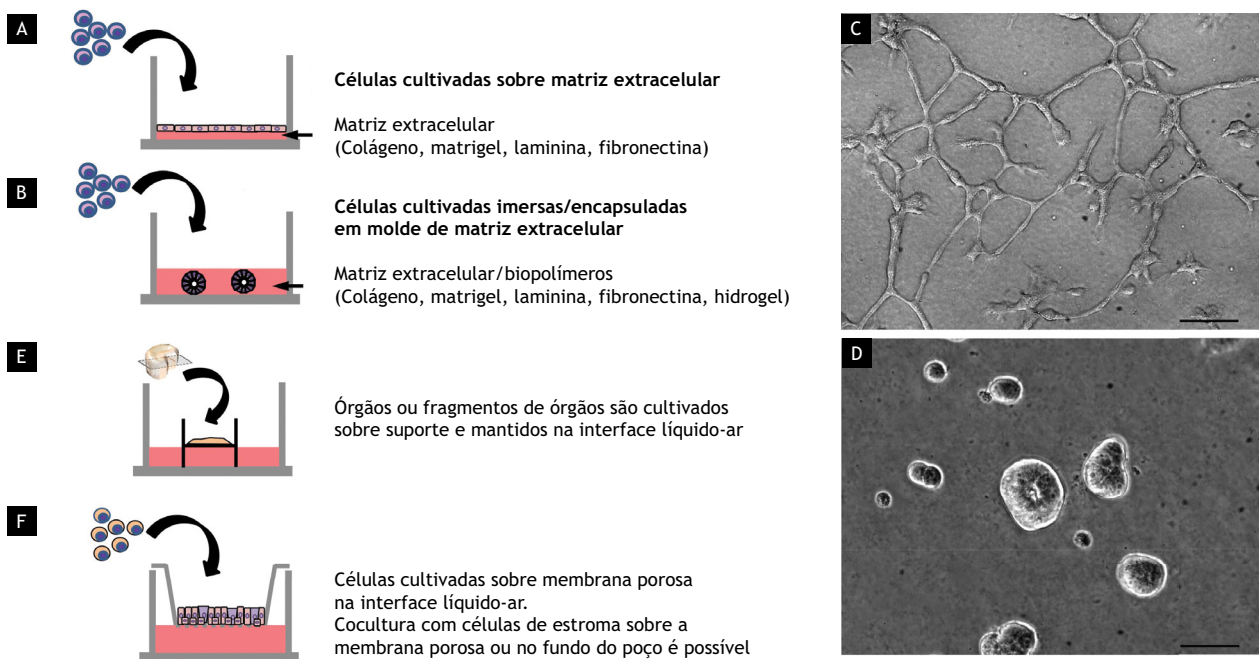


Figura 1. Modelos de cultura de células e culturas organotípicas. (A) Modelo de cultura sobre biopolímero. As células são distribuídas em frascos de cultura cuja superfície foi recoberta com moléculas de matriz extracelular, como colágeno I e matrigel. (B) Modelo de cultura em molde de biopolímero natural ou sintético. As células são encapsuladas em gel de biopolímero, o que permite sua organização tridimensional mais fisiológica (C-D). Linhagens humanas de tumor de mama basal MDA-MB-231 (C) e luminal T-47D (D) foram encapsuladas em matrigel (cultivo 3D), formando, respectivamente, estruturas semelhantes a dutos ramificados (C) ou ácinos (D). Contraste de fase. Barras = 100 µm (C) e 50 µm (D). (E-F) Cultura sobre suporte mecânico. Órgãos ou fragmentos de órgãos (E) e células (F) são cultivados em inserto na interface líquido-ar.



organ culture) foi um dos mais amplamente utilizados, tendo contribuído de forma relevante na compreensão das etapas e mecanismos de diferenciação de linfócitos T^{80,81,82,83}.

Este tipo de modelo com suporte mecânico foi mais recentemente adaptado para cultura de células que tradicionalmente se encontram em contato com o ar *in vivo*, como queratinócitos e epitélio respiratório (Figura 1F). As células são cultivadas sobre membrana porosa de inserto e expostas à interface líquido-ar. A superfície da membrana pode ser coberta por matriz extracelular e, ainda, este modelo permite cocultura com fibroblastos, que, imersos na matriz de colágeno, mimetizam o estroma subjacente. Queratinócitos derivados da epiderme, quando cultivados em meio líquido, formam uma monocamada, mas, ao serem expostos a uma interface líquido-ar, estratificam e diferenciam-se formando uma camada queratinizada^{63,84}. De maneira similar, as células das vias aéreas condutoras cultivadas neste sistema se organizam de forma mais fisiológica, reproduzindo a morfologia do epitélio respiratório, ou seja, um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, onde células caliciformes podem ser observadas^{85,86,87,88}. O potencial destes sistemas de cultura, não só na compreensão de mecanismos de morfogênese e de propriedades biológicas dos epitélios, mas, sobretudo, como modelos alternativos para teste de novos fármacos e de citotoxicidade, é evidente. De fato, modelos de epiderme, como o EpiSkin (L'Oreal e Shanghai EpiSkin Biotechnology Ltd.), e de epitélio respiratório, como o EpiAirwayTM (MatTek Corporation) e o MucilAirTM (Epithelix) estão comercialmente disponíveis atualmente.

Agregados celulares 3D: esferoide multicelular

O modelo de cultura 3D do tipo esferoide multicelular foi inicialmente desenvolvido como reagregados celulares para estudo de

biologia do desenvolvimento nas décadas de 1940-1950^{89,90,91}. A partir da década de 1970, Sutherland et al.⁹² impulsionaram as pesquisas na área de oncologia, ao propor o modelo para estudo sistemático da resposta dos tumores à radioterapia e a drogas^{89,90}. O modelo de esferoide multicelular baseia-se na capacidade de adesão homotípica célula-célula, quando sua adesão ao plástico dos frascos de cultura é impedida. De forma geral, os métodos (Figura 2A) como a técnica de cultura em gota pendente, o cultivo em superfícies não aderentes^{89,90,91,93,94} e, mais recentemente, o método de levitação magnética (MLM - *magnetic levitation method*), no qual as células são cultivadas com nanopartículas e mantidas em cultura com campo magnético⁹⁵, permitem a formação de agregados celulares arredondados (Figura 2B). O tamanho dos esferoides varia em função do número de células cultivadas e do tipo celular. Além disso, diferenças na capacidade de estabelecer adesões célula-célula influenciam a formação dos esferoides, que podem ser mais frouxos, com uma superfície irregular, ou mais firmes (Figura 2B)^{33,54,89,90}. O modelo permite o cocultivo de diferentes tipos celulares e é interessante que nestes esferoides as células se organizam espontaneamente, depositam matriz extracelular e formam microambientes específicos^{89,90,91,96,97}. Em função da difusão da periferia, em contato com o meio de cultura, para o centro do esferoide, um gradiente químico de O₂ e de nutrientes e metabólitos celulares se estabelece ao longo do raio do esferoide (Figura 2C). Essa difusão pode ser melhorada com o uso de biorreatores⁵³. Deve ser dito que diversos tipos de biorreatores estão hoje disponíveis, mas nem todos serão igualmente adequados.

A concentração de O₂ no centro do esferoide correlaciona-se inversamente com o tamanho do mesmo e, embora variações sejam observadas, em geral os esferoides de diâmetro acima de 500 µm

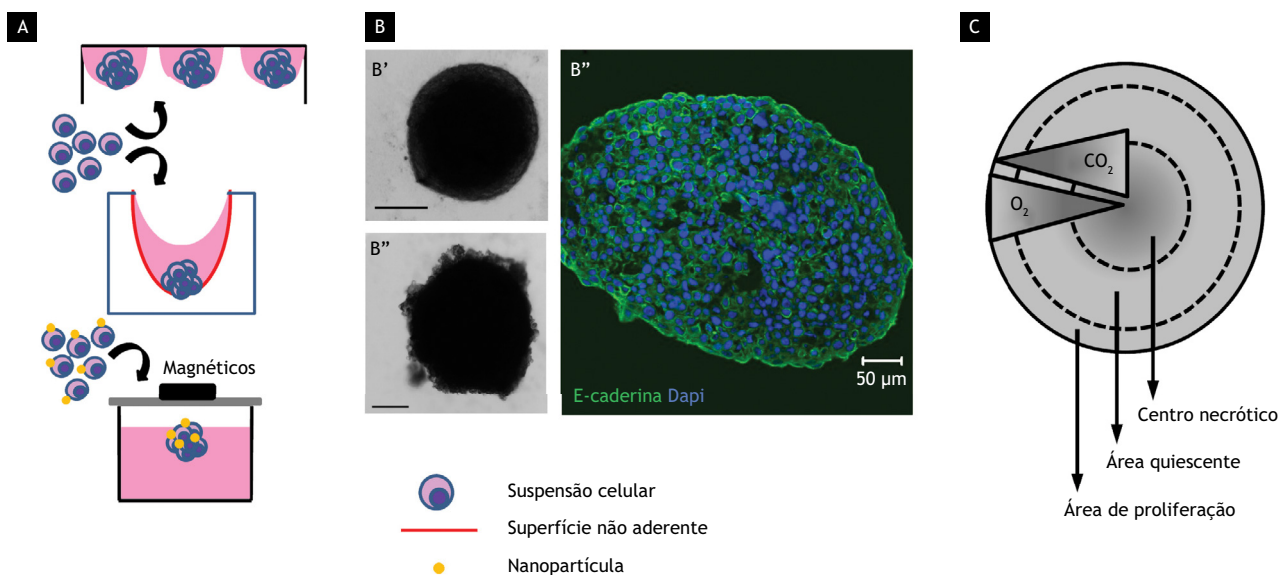


Figura 2. Modelo de cultura 3D do tipo esferoide multicelular. (A) Suspensão celular cultivada utilizando a técnica de gota pendente (acima), em frasco de cultura com superfície modificada para impedir a adesão (meio) e utilizando a técnica de levitação magnética, na qual as células são incubadas com nanopartícula e expostas a um campo magnético. (B) Morfologia dos esferoides de fibroblasto humano (B') e de linhagens humanas de tumor de mama luminal, MCF-7 (B'') e basal MDA-MB-231 (B'''). Notar a superfície irregular do esferoide de MDA-MB-231 quando comparado ao do de fibroblasto e a expressão da molécula de adesão E-caderina (em verde) nas células de MCF-7. Núcleos corados com DAPI (em azul). Contraste de fase (B' e B''') e microscopia confocal (B''). Barras = 50µm. (C) Esquema de esferoide mostrando gradiente de O₂ e CO₂ do centro para a periferia e as regiões de proliferação, quiescência e morte celular que podem ser observadas estão indicadas.



desenvolvem apoptose e necrose das células localizadas na região central em função da hipóxia. Esta zona central é circundada por uma região de células quiescentes e, mais externamente, pode-se formar uma zona de proliferação, presente nos esferoides de células tumorais, mas praticamente ausente naqueles formados por células não transformadas^{54,89,90,91,93,94,97,98,99,100,101,102}.

A hipóxia central e as diversas regiões formadas tornam o modelo especialmente vantajoso na área de oncologia por se assemelhar a nódulos tumorais não vascularizados^{54,103}. Por outro lado, o modelo também pode favorecer o estudo de mecanismos de angiogênese, quando coculturas com células endoteliais são estabelecidas^{101,104,105,106}. Digno de nota, a integração das células endoteliais no modelo de esferoide de cardiomiócitos murinos promoveu sobrevivência das células, sugerindo que houve melhora na difusão das moléculas presentes no meio de cultura¹⁰⁵. O modelo vem sendo utilizado, com discernimento e menor frequência em função do possível desenvolvimento de necrose central, na área de bioengenharia tecidual^{106,107,108}.

A semelhança dos esferoides com nódulos tumorais avascularizados impulsionou sua aplicação em testes com quimioterápicos e novos fármacos. Diversos ensaios mostraram que enquanto células tumorais em monocamada foram sensíveis à ação de diversos quimioterápicos, quando cultivadas em modelo de esferoide mostraram-se resistentes. Por outro lado, algumas drogas mostraram-se eficazes somente quando as células se encontravam em ambiente 3D^{54,103,109,110}. Como resultado dessas diferenças, ensaios de alto desempenho com modelo de esferoide para triagem de fármacos antitumorais (*high-throughput screening assay*) têm sido cada vez mais frequentes^{54,103,111,112,113,114,115}. Concomitantemente, novas ferramentas de análise têm sido desenvolvidas^{116,117,118}, o que reforça o potencial deste modelo na área de oncologia.

Modelos de cultura microfluídica e de órgãos em chip

A ausência de vasos sanguíneos na maioria dos modelos 3D tem impacto sobre o transporte de fluidos e pequenas moléculas^{119,120}. Com o objetivo de tornar mais fisiológico os modelos 3D de cultura de células, técnicas que possibilitam criar um controle espacial dos fluidos, denominadas de microfluídica (*Microfluidic techniques*), têm sido desenvolvidas. O controle do fluxo de fluidos permite regular os gradientes químicos e, conseqüentemente, a formação de microambientes específicos. O controle espacial é a base da técnica e os modelos mais sofisticados envolvem equipes multidisciplinares para a criação de canais padronizados de tamanho micrométrico (*multipatterning*) em moldes de biopolímero^{53,119,120,121}.

A microfluídica, aliada à cultura de células 3D, possibilitou o cultivo de órgãos em *chips*, onde os microcanais preenchidos com meios de cultura interligam cavidades de formatos específicos que mimetizam os órgãos de onde as células são retiradas¹²². As células são cultivadas nessas cavidades específicas e a interação entre os diferentes tipos celulares, que formam os órgãos sobre o *chip*, ocorre por meio dos microcanais. Essa comunicação possibilita o estudo toxicológico sistêmico¹²³, pois a microfluídica permite a interligação de câmaras que mimetizam órgãos

diferentes, os chamados “*body-on-a-chip*”^{124,125,126}. Somado a esse sistema sobre *chip*, forças mecânicas podem ser empregadas ao substrato onde as células são cultivadas de modo a gerar estímulos que mimetizem o observado *in vivo*, como, por exemplo, a contração cardíaca e o movimento de inspiração e expiração pulmonar^{127,128}. Esses estímulos mecânicos modulam o comportamento celular tornando o sistema mais fisiológico¹²⁹. O potencial destes modelos na área de bioengenharia e de substituição de experimentação animal é inegável.

Vantagens e limitações

Não restam dúvidas de que os modelos 3D de cultura de células, por mimetizarem melhor as condições *in vivo*, trouxeram grandes avanços em diversas áreas do conhecimento, o que inclui influência do microambiente em diversas propriedades celulares (expressão de genes e proteínas, proliferação, morte, migração e diferenciação), morfogênese, modelagem de doenças e ensaios de citotoxicidade para avaliação de novos fármacos^{46,47,48,49,50,51,53,54,55,63,64,73}. Além disso, esses sistemas abrem a possibilidade de serem realizados estudos personalizados, com o cultivo de células extraídas de tecidos *ex vivo* (culturas primárias) em sistemas mais fisiológicos. Assim, cada indivíduo teria suas próprias células cultivadas em diferentes modelos e sua resposta celular seria testada frente a drogas a serem estudadas para o desenvolvimento de medicamentos ou terapias específicas para o indivíduo em questão^{74,120,130,131,132,133}.

A grande maioria destes modelos permite fácil manipulação, teste rápido de hipóteses e análises em tempo real, quando comparados a modelos *in vivo*. Portanto, estes sistemas são candidatos a métodos alternativos ao uso de animais em experimentação. De fato, em algumas áreas, como na de citotoxicidade de cosméticos, modelos *in vitro* 3D estão sendo utilizados em substituição ao teste *in vivo*, erradicado em vários países. No entanto, mesmo nesta área, algumas limitações do modelo devem ser consideradas, como veremos.

A escolha do modelo, que deve levar em conta vários fatores, como o tipo celular e a aplicação do estudo é fundamental na reprodutibilidade dos resultados. Por exemplo, células epiteliais de revestimento podem formar múltiplas camadas ou não, mas encontram-se apoiadas sobre membrana basal e apresentam uma polarização baso-apical. Por outro lado, alguns tipos celulares encontram-se imersos em uma matriz extracelular com características próprias. Exemplificando, osteoblastos estão associados a uma matriz rígida por associação de cristais de hidroxiapatita com moléculas de colágeno I, num processo denominado de mineralização da matriz. Ou seja, o tipo de molde pode ter impacto nos resultados obtidos. Como vimos, os componentes da matriz extracelular incluem uma grande variedade de moléculas, que se associam entre si e ligam fatores de crescimento e citocinas, criando microambientes específicos. As diferenças na composição da matriz alteram sua organização tridimensional, suas propriedades mecânicas e o gradiente químico^{27,29,32}. Não só, mas a polimerização de alguns componentes da matriz pode criar diferenças estruturais que impactam as propriedades celulares. Por exemplo, diferenças no diâmetro das fibrilas e na porosidade da matriz



de colágeno I derivada de rabo de rato ou de derme de bovino tiveram impacto na migração de linhagens celulares tumorais¹³⁴. O grupo de Tatiana Coelho-Sampaio mostrou que o pH altera o padrão de polimerização da laminina, o que, por sua vez, modifica o comportamento de diversos tipos celulares^{68,135,136}. A variação na polimerização destes biopolímeros também ocorre em função de diferenças na sua extração, como no caso do matrigel, que é comercialmente disponível, mas que varia de lote para lote na sua propriedade de induzir tubulogênese, o que certamente tem impacto na reprodutibilidade dos resultados^{54,137}. Ou seja, ainda é desafiador reproduzir, nas condições de cultura, as propriedades mecânicas, a porosidade, a elasticidade e o gradiente químico da matriz extracelular dos tecidos. Mesmo no caso dos órgãos engenheirados, os modelos de órgãos em *chip*, mimetizar a proporção de massa e volume ou determinar os vários tipos celulares que serão incluídos são desafios que vão além da microfluídica e da engenharia de arcabouços que mimetizem órgãos¹³⁸. Ou seja, é necessária a padronização dos modelos, com critérios bem definidos, para reduzir a variação nos resultados. Além disso, o custo deve ser levado em conta, assim como a ausência de métodos controlados de avaliação em larga escala dos efeitos obtidos^{53,54}.

A utilização dos modelos 3D de cultura em substituição ao uso de animais em experimentação deve levar em consideração ainda que mesmo os modelos mais complexos representam somente parcialmente as características dos órgãos e tecidos. Ou seja, o microambiente é mais simples do que o observado *in vivo* e, portanto, diversos mecanismos fisiopatológicos não são reproduzidos. *In vivo*, diversos sistemas interagem e, portanto, o microambiente é mais complexo, com contribuição de células do sistema linfematopoiético e nervoso, além do vascular, já abordado. Macrófagos, células dendríticas, apresentadoras de antígeno, e linfócitos, entre outras, compõem o microambiente, mas estão ausentes na grande maioria dos modelos, comprometendo a avaliação de efeitos inflamatórios e de hipersensibilidade^{47,63}. Finalmente, os sistemas de cultura desenvolvidos até o

momento, além das limitações espaciais, têm limitação temporal, pois são sistemas que mimetizam eventos de curta duração, enquanto *in vivo* os eventos se sucedem, ou seja, progridem⁴⁷.

CONCLUSÕES

A busca por modelos *in vitro* alternativos ao uso de animais de laboratório, em consonância com a política dos 3Rs, e que, ao mesmo tempo permitam alcançar resultados reprodutíveis e preditivos dos obtidos em ensaios clínicos, é imperativa. Neste sentido, sistemas de cultura 3D de células, que mimetizam a complexidade dos tecidos, têm sido desenvolvidos. De forma geral, permitem interações célula-célula e entre estas e a matriz extracelular, depositada pelas próprias células ou derivadas de matriz natural ou sintética, o que leva a uma organização morfológica das células e regula suas propriedades biológicas. Além disso, gradientes físicos e químicos podem se formar nestes modelos, o que também contribui para a modulação do comportamento das células. A escolha do modelo deve levar em conta não só o tipo de tecido-alvo, mas também o efeito que se objetiva averiguar, pois as vantagens, assim como as limitações, são próprias de cada modelo. O próprio aspecto inovador dos modelos de cultura 3D acompanha-se de desafios a sua validação como modelo substitutivo aos ensaios clássicos. Um aspecto fundamental, que é a reprodutibilidade dos resultados, depende da harmonização de protocolos, da padronização de métodos de cultivo em diferentes laboratórios, das boas práticas em métodos *in vitro*, da realização de ensaios multilaboratoriais, da automação dos métodos de análise e de avaliações de vias de efeito adverso, como recomendado por organizações internacionais, como a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*). Apesar desses desafios, os sistemas de cultura 3D são um passo na direção de modelos mais próximos da complexidade dos tecidos e, portanto, são bons candidatos a modelos alternativos ao uso de animais de experimentação.

REFERÊNCIAS

1. U.S. Department of Energy. Human genome project information archive 1999-2003. Washington, DC: U.S. Department of Energy; 2015 [acesso 11 ago 2017]. Disponível em: http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/index.shtml
2. Venter JC, Smith HO, Adams MD. The sequence of the human genome. *Clin Chem*. 2015;61(9):1207-8. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.237016>
3. Migliaccio AR, Quarto R, Piacibello W. Cell therapy: Filling the gap between basic science and clinical trials October 15-17, 2001, Rome, Italy. *Stem Cells*. 2001;21(3):348-56. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-3-348>
4. Nabel GJ. Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. *Nat Med*. 2004;10:135-41. <https://doi.org/10.1038/nm990>
5. Chien KR. Regenerative medicine and human models of human disease. *Nature*. 2008;453(7193):302-5. <https://doi.org/10.1038/nature07037>
6. Abdeen AA, Saha K. Manufacturing cell therapies using engineered biomaterials. *Trends Biotechnol*. 2017;35(10):971-82. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.008>
7. Petricciani J, Hayakawa T, Stacey G, Trouvin JH, Knezevic I. Scientific considerations for the regulatory evaluation of cell therapy products. *Biologicals*. 2017;50:20-6. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.08.011>
8. Twigger AJ, Scheel CH. Advances in stem cells and regenerative medicine: single-cell dynamics, new models and translational perspectives. *Development*. 2017;144(17):3007-3011. <https://doi.org/10.1242/dev.153569>



9. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010;329(5987):52-6. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>
10. Annaluru N, Muller H, Mitchell LA et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*. 2014;344(6179):55-8. <https://doi.org/10.1126/science.1249252>
11. Bosley KS, Botchan M, Brederood AL, Carroll D, Charo RA, Corn J et al. CRISPR germline engineering—the community speaks. *Nat Biotech*. 2015;33(5):478-86. <https://doi.org/10.1038/nbt.3227>
12. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017;548(7668):413-19. <https://doi.org/10.1038/nature23305>
13. Edwards C. American biotechnology needs a strategic planning center. *Nat. Biotech*. 1983;1(1):7. <https://doi.org/10.1038/nbt0383-7a>
14. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Preparing for future products of biotechnology. Washington, DC: The National Academies; 2017.
15. Senado Federal (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal; 1988.
16. Brasil. Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 5 fev 1997.
17. 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.
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução - RDC Nº 9, de 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 16 mar 2011.
19. Basketter DA, Clewell H, Kimber I, Rossi A, Blaauboer B, Burrier R et al. A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing - t4 report. *ALTEX*. 2012;29(1):3-91. <https://doi.org/10.14573/altex.2012.1.003>
20. Burden N, Sewell F, Chapman K. Testing chemical safety: what is needed to ensure the widespread application of non-animal approaches? *PLoS Biol*. 2015;13(5):e1002156. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002156>
21. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. New York: John Wiley & Sons; 2005.
22. Meleady P, O'Connor R. General procedures for cell culture. In: Celis JE, editor. *Cell biology: a laboratory handbook*. 3rd ed. New York: Elsevier; 2006. p. 13-20.
23. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 1):19-29. <https://doi.org/10.1242/jcs.00930>
24. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(5):509-14. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00101-7)
25. Huvneers S, Rooij J. Mechanosensitive systems at the cadherin-F-actin interface. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 2):403-13. <https://doi.org/10.1242/jcs.109447>
26. Twiss F, Rooij J. Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(21):4101-16. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1329-x>
27. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326(5957):1216-9. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
28. Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(5):a005033. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005033>
29. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):771-85. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
30. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
31. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009;324(5935):1673-7. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>
32. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):802-12. <https://doi.org/10.1038/nrm3896>
33. Rossi MI, Barros AP, Baptista LS, Garzoni LR, Meirelles MN, Takiya CM et al. Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional *in vitro* culture system for the study of hematopoietic cell migration. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(10):1455-62. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005001000002>
34. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):75-82. <https://doi.org/10.1038/nrm2594>
35. Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(5):830-3. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>
36. Bonfim DC, Dias RB, Fortuna-Costa A, Chicaybam L, Lopes DV, Dutra HS et al. PS1/ γ -secretase-mediated cadherin cleavage induces β -catenin nuclear translocation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3865315. <https://doi.org/10.1155/2016/3865315>



37. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(13):5431-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701152104>
38. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(12):5510-4. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
39. Young EW, Beebe DJ. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem Soc Rev*. 2010 Mar;39(3):1036-48. <https://doi.org/10.1039/b909900j>
40. Bollenbach T, Heisenberg CP. Gradients are shaping up. *Cell*. 2015;161(3):431-2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.009>
41. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein—basic fibroblast growth factor—is stored within basement membrane. *Am J Pathol*. 1988;130(2):393-400.
42. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):11-21. <https://doi.org/10.1038/nrm2319>
43. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol*. 2010;695:155-68. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7037-4_11
44. Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*. 2010;6(2):103-15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.01.011>
45. Rossi MI, Borojevic R. Homeostasia dos tecidos. In: Gehn PM, organizador. *Tratado de oncologia*. São Paulo: Atheneu; 2013. Vol. 1, p. 232-44.
46. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):211-24. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>
47. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601-10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006>
48. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 13):3015-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>
49. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
50. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5517-27. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
51. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
52. Oudin MJ, Weaver VM. Physical and chemical gradients in the tumor microenvironment regulate tumor cell invasion, migration, and metastasis. Cold Spring Harbor Lab Press. 2016;81:189-205. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030817>
53. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-77. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
54. Verjans ET, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: worth the effort? *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2993-3003. <https://doi.org/10.1002/jcp.26052>
55. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation *in vitro*: a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(5):405-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009>
56. Olsavsky KM, Page JL, Johnson MC, Zarbl H, Strom SC, Omiecinski CJ. Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(1):42-56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.032>
57. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*. 1997;137(1):231-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.1.231>
58. Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P et al. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(25):14821-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14821>
59. Goodbye, flat biology? [Editorial]. *Nature*. 2003;424(6951):861. <https://doi.org/10.1038/424861b>
60. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. 2003;424(6951):870-2. <https://doi.org/10.1038/424870a>
61. Andrade LR, Arcanjo KD, Martins HS, dos Reis JS, Farina M, Borojevic R et al. Fine structure and molecular content of human chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Cell Biol Int*. 2011;35(3):293-7. <https://doi.org/10.1042/CBI20100273>
62. Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Characterization and evaluation of chitosan matrix for *in vitro* growth of MCF-7 breast cancer cell lines. *Biomaterials*. 2004;25(21):5147-54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.025>
63. Shamir ER, Ewald AJ. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(10):647-64. <https://doi.org/10.1038/nrm3873>
64. Choi J, Lee EK, Choo J, Yuh J, Hong JW. Micro 3D cell culture systems for cellular behavior studies: culture matrices, devices, substrates, and *in-situ* sensing methods. *Biotechnol J*. 2015;10(11):1682-8. <https://doi.org/10.1002/biot.201500092>
65. Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res*. 1978;38(11 Pt 2):4155-71.



66. Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol.* 1983;97(1):153-65. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.1.153>
67. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988;107(4):1589-98. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.4.1589>
68. Freire E, Gomes FC, Linden R, Neto VM, Coelho-Sampaio T. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4867-76. <https://doi.org/10.1242/jcs.00173>
69. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001;294(5547):1708-12. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>
70. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 2003;160(2):267-77. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209006>
71. Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development.* 2001;128(16):3117-31.
72. Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.* 2007;4(4):359-65. <https://doi.org/10.1038/nmeth1015>
73. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* 2014;345(6194):1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
74. Bartfeld S, Clevers H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl).* 2017;95(7):729-38. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>
75. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262-5. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
76. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science.* 2013;340(6137):1190-4. <https://doi.org/10.1126/science.1234852>
77. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-9. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
78. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science.* 2016;352(6287):816-8. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6116>
79. Xinaris C, Brizi V, Remuzzi G. Organoid models and applications in biomedical research. *Nephron.* 2015;130(3):191-9. <https://doi.org/10.1159/000433566>
80. Jenkinson EJ, Van Ewijk W, Owen JJ. Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice. *J Exp Med.* 1981;153(2):280-92. <https://doi.org/10.1084/jem.153.2.280>
81. Thesleff I, Sahlberg C. Organ culture in the analysis of tissue interactions. *Methods Mol Biol.* 2008;461:23-30. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-483-8_3
82. Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G. In vitro models of T cell development. *Semin Immunol.* 1999;11(1):3-12. <https://doi.org/10.1006/smim.1998.0151>
83. Plum J, De Smedt M, Verhasselt B, Kerre T, Vanhecke D, Vandekerckhove B et al. Human T lymphopoiesis. In vitro and in vivo study models. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917(1):724-31. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05436.x>
84. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(11):5665-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5665>
85. Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol.* 1992;262(6 Pt 1):L713-24. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.6.L713>
86. Karp PH, Moninger TO, Weber SP, Nesselhauf TS, Launspach JL, Zabner J et al. An in vitro model of differentiated human airway epithelia: methods for establishing primary cultures. *Methods Mol Biol.* 2002;188:115-37. <https://doi.org/10.1385/1-59259-185-X:115>
87. Pezzulo AA, Starner TD, Scheetz TE, Traver GL, Tilley AE, Harvey BG et al. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300(1):L25-31. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00256.2010>
88. Azzopardi D, Haswell LE, Foss-Smith G, Hewitt K, Asquith N, Corke S et al. Evaluation of an air-liquid interface cell culture model for studies on the inflammatory and cytotoxic responses to tobacco smoke aerosols. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(7):1720-8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.016>
89. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol.* 1997;273(4 Pt 1):C1109-23. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1109>
90. Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int.* 1999;23(3):157-61. <https://doi.org/10.1006/cbir.1999.0384>
91. Layer PG, Robitzki A, Rothermel A, Willbold E. Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci.* 2002;25(3):131-4. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02036-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02036-1)
92. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1971;46(1):113-20. <https://doi.org/10.1093/jnci/46.1.113>



93. Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol*. 1998;79(1):1-23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1998.00051.x>
94. Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol*. 2004;22(4):195-202. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.002>
95. Haisler WL, Timm DM, Gage JA, Tseng H, Killian TC, Souza GR. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc*. 2013;8(10):1940-9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125>
96. Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R, de Meirelles MN. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis*. 2008 Mar;197(6):906-15. <https://doi.org/10.1086/528373PMID:18279074>
97. Barros AP, Takiya CM, Garzoni LR, Leal-Ferreira ML, Dutra HS, Chiarini LB et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D *in vitro* model. *PLoS One*. 2010;5(2):e9093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009093>
98. Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br J Cancer*. 1987;56(3):325-7. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.197>
99. Walenta S, Dötsch J, Bourrat-Flöck B, Mueller-Klieser W. Size-dependent oxygenation and energy status in multicellular tumor spheroids. *Adv Exp Med Biol*. 1990;277:889-93. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8181-5_102
100. Walenta S, Doetsch J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Metabolic imaging in multicellular spheroids of oncogene-transfected fibroblasts. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(4):509-22. <https://doi.org/10.1177/002215540004800409>
101. Timmins NE, Dietmair S, Nielsen LK. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis*. 2004;7(2):97-103. <https://doi.org/10.1007/s10456-004-8911-7>
102. Schmitz A, Fischer SC, Mattheyer C, Pampaloni F, Stelzer EH. Multiscale image analysis reveals structural heterogeneity of the cell microenvironment in homotypic spheroids. *Sci Rep*. 2017;7:43693. <https://doi.org/10.1038/srep43693>
103. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 2009;4(3):309-24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
104. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol*. 1998;143(5):1341-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.5.1341>
105. Garzoni LR, Rossi MI, Barros AP, Guarani V, Keramidas M, Balottin LB et al. Dissecting coronary angiogenesis: 3D co-culture of cardiomyocytes with endothelial or mesenchymal cells. *Exp Cell Res*. 2009;315(19):3406-18. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.016>
106. Laschke MW, Menger MD. Spheroids as vascularization units: from angiogenesis research to tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 2017;35(6):782-91. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.002>
107. Lee JH, Lee DH, Lee S, Kwon CH, Ryu JN, Noh JK et al. Functional evaluation of a bioartificial liver support system using immobilized hepatocyte spheroids in a porcine model of acute liver failure. *Sci Rep*. 2017;7(1):3804. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03424-2PMID:28630420>
108. Dinh PC, Cores J, Hensley MT, Vandergriff AC, Tang J, Allen TA et al. Derivation of therapeutic lung spheroid cells from minimally invasive transbronchial pulmonary biopsies. *Respir Res*. 2017;18(1):132. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0611-0>
109. Howes AL, Chiang GG, Lang ES, Ho CB, Powis G, Vuori K et al. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(9):2505-14. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0698>
110. Barbone D, Yang TM, Morgan JR, Gaudino G, Broaddus VC. Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem*. 2008;283(19):13021-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709698200>
111. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen*. 2004;9(4):273-85. <https://doi.org/10.1177/1087057104265040>
112. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*. 2010;148(1):3-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>
113. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst (Lond)*. 2011;136(3):473-8. <https://doi.org/10.1039/COAN00609B>
114. Ivanov DP, Grabowska AM. Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. *Sci Rep*. 2017;7:41160. <https://doi.org/10.1038/srep41160>
115. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017;108(3):283-9. <https://doi.org/10.1111/cas.13155>
116. Chen W, Wong C, Vosburgh E, Levine AJ, Foran DJ, Xu EY. High-throughput image analysis of tumor spheroids: a user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *J Vis Exp*. 2014;(89):e51639. <https://doi.org/10.3791/51639>
117. Cisneros Castillo LR, Oancea AD, Stüllein C, Régnier-Vigouroux A. A novel computer-assisted approach to evaluate multicellular tumor spheroid invasion assay. *Sci Rep*. 2016;6(1):35099. <https://doi.org/10.1038/srep35099>



118. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R et al. 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*. 2016;6(1):19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
119. Lo RC. Application of microfluidics in chemical engineering. *Chem Eng Process Tech*. 2013;1:1002.
120. Duinen V, Trietsch SJ, Joore J, Vulto P, Hankemeier T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;35:118-26. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.05.002>
121. Picollet-D'hahan N, Dolega ME, Liguori L, Marquette C, Le Gac S, Gidrol X et al. A 3D Toolbox to enhance physiological relevance of human tissue models. *Trends Biotechnol*. 2016;34(9):757-69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.012>
122. Chen Y, Chan HN, Michael SA, Shen Y, Chen Y, Tian Q et al. A microfluidic circulatory system integrated with capillary-assisted pressure sensors. *Lab Chip*. 2017;17(4):653-62. <https://doi.org/10.1039/C6LC01427E>
123. Bovard D, Iskandar A, Luettich K, Hong J, Peitsch MC. Organ-on-a-chip: A new paradigm for toxicological assessment and preclinical drug development. *Toxicol Res Appl*. 2017;1:1-16. <https://doi.org/10.1177/2397847317726351>
124. Sung JH, Esch MB, Prot JM, Long CJ, Smith A, Hickman JJ et al. Microfabricated mammalian organ systems and their integration into models of whole animals and humans. *Lab Chip*. 2013;13(7):1201-12. <https://doi.org/10.1039/c3lc41017j>
125. Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, Hasenberg T, Ramme AP, Hübner J et al. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip*. 2015;15(12):2688-99. <https://doi.org/10.1039/C5LC00392J>
126. Miller PG, Shuler ML. Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(10):2213-27. <https://doi.org/10.1002/bit.25989>
127. Shimizu T, Yamato M, Itoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*. 2002;90(3):e40. <https://doi.org/10.1161/hh0302.105722>
128. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*. 2010;328(5986):1662-8. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
129. Bhise NS, Ribas J, Manoharan V, Zhang YS, Polini A, Massa S et al. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *J Control Release*. 2014;190:82-93. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.004>
130. Arrigoni C, Gilardi M, Bersini S, Candrian C, Moretti M. Bioprinting and Organ-on-chip applications towards personalized medicine for bone diseases. *Stem Cell Rev*. 2017;13(3):407-17. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9741-5>
131. Khazali AS, Clark AM, Wells A. A pathway to personalizing therapy for metastases using liver-on-a-chip platforms. *Stem Cell Rev*. 2017;13(3):364-80. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9735-3>
132. Jeppesen M, Hagel G, Glenthøj A, Vainer B, Ibsen P, Harling H et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an *in vitro* model for personalizing cancer medicine. *PLoS One*. 2017;12(9):e0183074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183074>
133. Fong EL, Toh TB, Yu H, Chow EK 3rd. Culture as a clinically relevant model for personalized medicine. *SLAS Technol*. 2017;22(3):245-53. <https://doi.org/10.1177/2472630317697251>
134. Wolf K, Te Lindert M, Krause M, Alexander S, Te Riet J, Willis AL et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol*. 2013;201(7):1069-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.201210152>
135. Barroso MM, Freire E, Limaverde GS, Rocha GM, Batista EJ, Weissmüller G et al. Artificial laminin polymers assembled in acidic pH mimic basement membrane organization. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11714-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709301200>
136. Hochman-Mendez C, Cantini M, Moratal D, Salmeron-Sanchez M, Coelho-Sampaio T. A fractal nature for polymerized laminin. *PLoS One*. 2014;9(10):e109388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109388>
137. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*. 2003;49(1):32-40. <https://doi.org/10.1373/49.1.32>
138. Takebe T, Zhang B, Radisic M. Synergistic engineering: organoids meet organs-on-a-chip. *Cell Stem Cell*. 2017;21(3):297-300. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.016>

Agradecimentos:

Os autores agradecem às Dras. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa, PhD, atualmente no Instituto de Traumatologia-Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil e Araci Maria da Rocha Rondon, PhD, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, pela colaboração na realização de culturas 3D com linhagens humanas de tumor de mama. Os autores agradecem ainda a Profa. Tatiana Lobo Coelho-Sampaio pelas informações a respeito do comportamento biológico de diferentes linhagens celulares cultivadas sobre matriz de laminina.

Financiamento e conflito de interesse

O trabalho foi financiado pelas agências de governo, Capes, Faperj e CNPq. Os autores declaram não ter conflito de interesses.



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.

Qualidade dos produtos de terapias avançadas: requisitos de células extensamente manipuladas usadas em terapias celulares e em bioengenharia

Quality of advanced therapy products: requirements of extensively manipulated cell used in cell therapy and bioengineering

RESUMO

Rosana Bizon Vieira Carias*

Karla Menezes

Esther Rieko Takamori

Radovan Borojevic

Introdução: O preparo de produtos para terapias avançadas inclui, frequentemente, a manipulação extensa de células primárias *in vitro*, o que pode acarretar em alterações da população celular final. A padronização dos métodos de obtenção das culturas, seguindo as regras das Boas Práticas de Fabricação, com a realização dos controles de qualidade do processo e do produto final, é essencial para garantir a segurança do paciente e a comparabilidade dos resultados clínicos obtidos. **Objetivo:** Este estudo buscou identificar os ensaios, 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. **Método:** Foi realizado o levantamento de artigos científicos e de normas sanitárias que tratassem de terapia celular e dos ensaios de qualidade associados. **Resultados:** Foi evidenciado que as normas regulamentares direcionadas a produtos com base em células cultivadas *in vitro* não detalham os ensaios de qualidade, o que torna urgente a discussão dessa matéria. **Conclusões:** Evidenciamos a necessidade de preparo do produto na forma de um lote de células, que deve ser controlado para a qualidade, a partir de amostras representativas do todo e propomos a realização de uma bateria de ensaios, que definem a qualidade do produto de terapia avançada, a base de células cultivadas *in vitro*, com detalhamento dos pontos em que estes devem ser realizados, organizados como fluxogramas de processamento.

PALAVRAS-CHAVE: Centro de Processamento Celular; Biotecnologia; Cultivo Primário; Cultura de Células; Controle de Qualidade

ABSTRACT

Introduction: Preparations of products for advanced therapies include an extensive manipulation stage of the cell primary culture, which can lead to changes in the final cellular population. Standardization of the technique for obtaining the cellular cultures, in complying with Good Manufacturing Practices (GMP), and carrying out quality controls of process and final product, are essential to ensure patient safety and comparability of clinical outcomes. **Objective:** The purpose of this study was to identify the most prevalent trials cited in the scientific literature or in health standards applied to the evaluation of the quality of human primary cells, which could be inserted in the routine of the Cell Processing Centers. **Method:** A survey was carried out of scientific articles and health standards related to cell therapy and associated quality assays. **Results:** This study showed that the advanced cellular therapy products regulation do not specify the tests that should be used for quality control or, when specified, do not define acceptance or rejection ranges for the products, which makes urgent the discussion of such matter. **Conclusions:** In this article, we highlight the need to prepare the product in the form of a single batch that should be quality-controlled from samples representative of the whole. In addition, we mention some of the trials that define the quality of the advanced cellular therapy product, detailing the points at which they are to be performed in the flowchart.

KEYWORDS: Cell Processing Center; Biotechnology; Primary Culture; Cell Culture; Quality Control

Faculdade de Medicina de
Petrópolis/FASE, Petrópolis, RJ,
Brasil

* E-mail: rosanabizon@gmail.com

Recebido: 29 set 2017

Aprovado: 31 jan 2018



INTRODUÇÃO

Células obtidas de tecidos humanos e cultivadas *in vitro* podem ser utilizadas em pesquisas clínicas ou em terapias e, até mesmo, serem disponibilizadas comercialmente, dependendo da regulação sanitária do país de origem.

Globalmente, para avaliar propostas de uso terapêutico de células, as agências regulatórias exigem que as células sejam preparadas em atendimento às Boas Práticas de Fabricação (BPF - *Good Manufacturing Practices*) e que tenham comprovação de segurança, reprodutibilidade e eficácia do uso^{1,2}. Além disso, dão tratamento regulatório diferenciado de acordo com o processamento laboratorial ao qual as células são submetidas, sendo este classificado em manipulação mínima ou manipulação extensa. A diferença básica para estes dois tipos de processamentos é a possibilidade da ocorrência de alterações significativas das características celulares fisiológicas, funcionais ou propriedades estruturais, relevantes para o uso pretendido, como estado de diferenciação, potencial de proliferação e atividade metabólica, para a manipulação extensa e a não possibilidade, para a manipulação mínima. Todo tipo de cultivo celular caracteriza manipulação extensa e atos como cortar, separar, centrifugar caracterizam a manipulação mínima. O segundo aspecto que dá tratamento diferenciado ao produto baseado em células é o uso, quando este é direcionado para que as células exerçam função diferente daquela de origem. Desta forma, células extensamente manipuladas *in vitro* ou células cuja função na terapia é diferente da sua função de origem, são classificadas como produtos de terapia avançada.

No Brasil, o uso clínico de células cultivadas *in vitro* é, atualmente, permitido apenas em pesquisas, desde que sejam aprovadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), ou em terapias, quando autorizadas pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) ou Conselho Federal de Odontologia (CFO), e desde que tais células tenham sido manipuladas em laboratórios autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), os Centros de Processamento Celular, conforme determinado pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) no 214, de 7 de fevereiro de 2018 ou pelas resoluções que venham a substituí-la³. Em condições excepcionais, o uso clínico das células cultivadas também é permitido, quando representa a única oportunidade de melhora do paciente que apresenta risco de morte. Sendo chamada terapia de compaixão, autoridades médicas e legais autorizam o uso proposto, num prazo muito curto, com base em dados publicados na literatura científica e na experiência do grupo clínico envolvido.

Em outros países, como nos EUA e Canadá, os produtos de terapia avançada são classificados como “Produtos de Terapia Avançada da Medicina Regenerativa”, regulamentados pela Seção nº 351 do Ato de Serviço de Saúde Pública dos EUA e podem ser disponibilizados comercialmente, após aprovação pela agência reguladora *Food and Drugs Administration* (FDA), por comprovação de segurança e eficácia. O primeiro produto de terapia avançada aprovado nos EUA foi o *Carticell* (condrócitos autólogos), em 1997, o qual foi seguido por outros, como *Laviv* (fibroblastos autólogos) e *Gentuit* (queratinócitos e fibroblastos alogênicos). O primeiro produto baseado em terapia celular e gênica, *CAR-T*,

teve aprovação inicial pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) em agosto de 2017 e segue em análise pela FDA.

Na União Europeia (UE), as terapias que fazem uso de células cultivadas *in vitro* são classificadas como Produtos Médicos de Terapia Avançada (PMTA) e reguladas pela diretiva UE nº 1.394/2007. Essa é aplicável a todos os países membros da Comunidade Europeia e contém as regras para autorização, inspeção e requerimentos técnicos relacionados às características e informações dos produtos, preparados na indústria ou em instituições acadêmicas. O Comitê para Terapias Avançadas (CAT - *Committee for Advanced Therapies*), da agência reguladora *European Medicines Agency* (EMA), centraliza as autorizações para comercialização dos PMTA. Em 2014, a EMA aprovou a primeira terapia baseada em células-tronco adultas, retiradas da córnea, cultivadas *in vitro* e aplicadas na regeneração da córnea do próprio paciente doador, o *Holoclar*.

Da mesma forma que é variável para cada comunidade, de acordo com sua estrutura regulatória, o entendimento de produtos de terapia avançada baseados em células cultivadas *in vitro*, também é variável a exigência da qualidade do produto final. Por unanimidade, as agências reguladoras afirmam que tais produtos devem ter qualidade, segurança e eficácia garantidas, mas não definem quais os ensaios de qualidade devem ser aplicados a cada situação. A escassez de detalhes acerca dos ensaios de qualidade que devem ser realizados, incluindo seus limites de aceitação, torna urgente sua discussão. É necessária sua descrição com definição dos requisitos de liberação das células para uso, o que será fundamental para a comparação dos resultados clínicos obtidos, tanto na pesquisa clínica, como na terapia.

Assim, nosso interesse segue no sentido de definir os ensaios que possam ser aplicados, de forma direta, às células preparadas para o uso clínico, e que estes se tornem uma ferramenta capaz de definir e harmonizar os produtos finais, estabelecendo a equivalência entre os lotes produzidos. Os ensaios deverão ser aplicados a todos os lotes de células preparadas, especialmente para aqueles que são criopreservados, descongelados e retornam ao cultivo *in vitro*, até o momento em que são solicitados para o uso clínico.

O presente estudo descreve uma bateria de ensaios que definem a qualidade do produto de terapia avançada, sempre que um dos componentes contenha as células cultivadas *in vitro*, e detalha os pontos em que estes devem ser realizados. Um fluxograma de processamentos para cada uma das principais situações de manipulação de células está proposto, e deve guiar tanto a aplicação de células extensamente manipuladas *in vitro* em estudos clínicos quanto o seu uso em procedimentos terapêuticos.

MÉTODO

Este estudo foi conduzido pelo levantamento de artigos científicos, com o objetivo de identificar os principais ensaios realizados para o controle de qualidade de células primárias humanas, cultivadas *in vitro*. A pesquisa de literatura científica foi realizada por consulta à base de dados PubMed (empregando palavras-chave como: *quality*



control, Cell Processing Center; Biotechnology; Primary Culture, Cell Culture, Cell Therapy). O levantamento realizado incluiu o período de 1990 até 2018. A pesquisa das exigências de realização de ensaios de controle de qualidade de produto e processo, definidas pela Anvisa, foi feita no sítio <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo de células primárias - matéria-prima para as terapias celulares

As células progenitoras mesenquimais (MSC) são consideradas atualmente o tipo celular mais frequentemente cultivado *in vitro* com a finalidade de uso em aplicação clínica. O primeiro pesquisador a isolar e caracterizar estas células a partir de amostra de medula óssea foi Friedenstein⁴. Desde então, outros tecidos foram utilizados como fonte, entre eles, o tecido adiposo, o cordão umbilical e a polpa dentária^{5,6,7}, devido ao grande interesse em seu potencial terapêutico em doenças isquêmicas, degenerativas, ou inflamatórias, como acidente vascular cerebral (AVC)⁸, isquemias de membros inferiores⁹, úlceras crônicas¹⁰, degeneração dos tecidos musculoesqueléticos^{11,12}, imunomodulação da doença enxerto versus hospedeiro, doença grave que acomete pacientes após a realização do transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas¹³, entre outras. Os benefícios clínicos do uso sistêmico das MSC são resultantes da combinação dos diferentes mecanismos de ação possíveis delas. Essas células progenitoras mostram o potencial de diferenciação em várias células do tecido lesionado: osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células de vasos sanguíneos, de músculo esquelético ou do tendão. Elas produzem as citocinas que promovem a angiogênese e/ou atraem novas células progenitoras teciduais ou, ainda, atuam na modulação e redução da atividade inflamatória local¹⁴. Estes processos dependem do tipo da lesão original, da qualidade do leito tecidual e da sua evolução, antes e depois do tratamento, fazendo que a compreensão e a comprovação da eficácia da terapia alcançada com o uso de MSC seja um desafio, tanto para os pesquisadores, quanto para as organizações regulatórias.

Muitos outros tipos celulares cultivados *in vitro* também possuem aplicação clínica, como os queratinócitos e melanócitos da pele humana, combinados ou não com fibroblastos e células mesenquimais, utilizados principalmente em terapias como queimadura, vitiligo, ulcerações crônicas^{10,15}. Já os condrócitos cultivados são utilizados em lesões da cartilagem¹⁶.

O ponto comum é que os protocolos clínicos de terapia celular e bioengenharia necessitam de elevado número de células. Assim, a possibilidade de aumento do número de células por meio do cultivo *in vitro* é uma grande vantagem, pois viabiliza o uso autólogo ou alogênico de células obtidas a partir de um pequeno volume de tecido doador, quando comparado à doação de tecido para transplante imediato. Entretanto, a fase de cultivo *in vitro* pode ter consequências complexas, ocasionalmente desastrosas. A maioria das culturas primárias são heterogêneas e os tipos celulares constituintes possuem capacidades proliferativas peculiares às características do tecido, do doador e/ou das condições ambientais. Os tipos que apresentam a taxa de proliferação maior tendem a dominar a cultura.

As condições de cultivo em baixas densidades celulares podem ter como consequência uma seleção clonal. Uma das maiores preocupações é a possível deriva de células cultivadas em células potencialmente neoplásicas, causando o crescimento celular canceroso depois da sua implantação terapêutica em organismo receptor. Além disso, as culturas podem apresentar contaminações, microbiológicas ou químicas, alterar a taxa normal de proliferação e diferenciação celular e entrar em senescência, num procedimento natural do esgotamento da sua capacidade de replicação, ou em resposta a condições sub-ótimas do sistema. Ou seja, o sistema de cultivo celular é complexo, dinâmico e de difícil padronização, o que torna o produto de terapia avançada a base de células cultivadas diferente dos produtos terapêuticos com bases químicas definidas.

Quando é alcançado o número desejado de células para a terapia, estas são, geralmente, criopreservadas em ultrabaixas temperaturas (menor que 135°C negativos), e assim permanecem mantendo as suas capacidades vitais até que sejam solicitadas para o uso clínico.

Os produtos de terapia avançada, a base de células cultivadas *in vitro*, devem ser preparados na forma de um lote homogêneo, viabilizando, desse modo, a utilização de pequena parte como amostra representativa do todo nos ensaios de controle de qualidade.

Ensaio de qualidade celular

O cultivo de células deve ser padronizado e acrescido dos controles de qualidade pertinentes, desde a obtenção da cultura primária até o lote preparado de células a ser liberado para uso. Diante de tantas variáveis e das possíveis adversidades do sistema, os controles devem assegurar a qualidade e possibilitar consequentemente a harmonização do produto de terapia avançada, e a definição das modificações clínicas resultantes da sua aplicação. Para uso de cada produto de terapia avançada são necessárias, minimamente, as informações sobre as propriedades listadas em seguida.

Pureza

A pureza compreende o resultado negativo para os ensaios de detecção de fungos, bactérias, incluindo os micoplasmas, e endotoxinas. São utilizados os ensaios recomendados pela farmacopeia nacional, para liberação de produtos estéreis.

Para a questão da pureza quanto à presença de vírus, as legislações sanitárias brasileira e da UE possuem uma lista pré-estabelecida de testes diagnósticos a serem realizados para a coleta de tecidos com finalidades terapêuticas. Entretanto, não há exigência para a realização de ensaios diagnósticos de patógenos virais, potencialmente presentes nos produtos de células cultivadas.

A RDC-Anvisa nº 214/2018, que regula os Centros de Tecnologia Celular, no Brasil, apresenta no artigo 60 os ensaios de qualidade e segurança de células cultivadas *in vitro* autólogas e alogênicas, sendo:

IV - para células (que não CPH-MO, CPH-SP ou CPH-SCUP, para fins de transplante convencional) e Produtos de Terapias Avançadas, em amostra do Produto Final: a) contagem do total de células relevantes; b) teste de identidade ou fenotipagem apropriado para o produto e quantificação das populações



celulares presentes; c) viabilidade celular; d) teste de pureza: inclui, quando couber, a verificação de substâncias ou células que possam ser prejudiciais ao Receptor e, no caso de Manipulação Extensa, obrigatoriamente a verificação da presença de endotoxinas; e) testes microbiológicos: deve-se seguir o disposto no art. 49 desta Resolução e, quando aplicável, realizar a repetição dos respectivos testes no Produto Final, e, em caso de Manipulação Extensa, incluir também o teste para detecção de contaminação por micoplasma; f) detecção de ácido nucleico dos vírus CMV, HIV-1 e HIV-2, HTLV-I e HTLV-II, EBV, HBV, HCV e B19, e, caso aplicável, de outros agentes virais de relevância clínica em humanos, somente em caso de Manipulação Extensa para uso alogênico; g) citogenética, somente em caso de Manipulação Extensa; e h) teste de potência, quando couber: a atividade biológica relevante das células, caso conhecida, ou dos produtos sintetizados pela célula deverá ser definida e quantificada.

O FDA-USA exige que o produto final contendo células, quando destinado para uso como produto terapêutico, seja testado para os patógenos Citomegalovírus (CMV), Vírus da Imunodeficiência Humana tipos 1 e 2 (HIV-1 e 2), Vírus Linfotrófico da Célula Humana tipos 1 e 2 (HTLV-1 e 2), Vírus Epstein-Barr (EBV), Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV), Eritrovírus B19 (B19) e, ainda, orienta que sejam avaliadas as condições gerais do processo, para identificação da necessidade da pesquisa de outros patógenos¹⁷.

O motivo da indicação da pesquisa de vírus, ao término do cultivo, deve-se ao fato de que muitos deles possuem a propriedade de manterem-se em estado de latência no organismo infectado. Pode ser citada, como exemplo, a família dos herpes vírus (Herpes simplex vírus - HSV), na qual estão incluídos o herpes oral (HSV tipo I), o Varicela-Zoster e o CMV. Depois da infecção primária, que pode ocorrer com ou sem sintomas, os herpes vírus podem permanecer latentes no interior de células por um período indeterminado e reativar sua replicação causando doença, devido à baixa imunológica do portador^{18,19}. As condições de cultivo celular podem ser propícias à reativação da atividade proliferativa dos vírus, presentes no tecido de origem da cultura primária. As infecções que as células, como produto terapêutico avançado, podem causar são potencialmente severas e até mesmo letais, de acordo com a condição geral do paciente receptor.

Aparência morfológica

A avaliação da qualidade das culturas primárias começa pela observação rotineira, ao microscópio óptico invertido e com contraste de fase, para determinar as suas características morfológicas. Esta prática permite ao manipulador habituar-se aos aspectos normais das culturas e perceber, precocemente, a ocorrência de eventos indesejados, como a presença de células morfológicamente distintas ou com aspecto indicativo de sofrimento. São exemplos de eventos indesejados para o cultivo a presença de contaminações químicas e/ou microbiológicas e o uso de materiais ou reagentes de baixa qualidade ou pureza.

As culturas primárias devem ter, portanto, acompanhamento rotineiro para a aparência morfológica, para observação dos seguintes aspectos:

- i. Verificação da presença de células com morfologia convencional, esperada em função da sua origem tecidual;
- ii. Verificação do percentual de confluência da monocamada;
- iii. Presença de sujidades (*debris*) e/ou células soltas e/ou mortas no sobrenadante, que é indicio de aplicação de sistema de cultivo insatisfatório ou presença de contaminações químicas ou microbiológicas.
- iv. Verificação da presença de células com morfologia modificada para: aumento do citoplasma celular com bordas irregulares, serrilhadas e mal definidas, aumento de organelas ou inclusões citoplasmáticas, aumento de vacúolos citoplasmáticos que são indícios de senescência celular, ou presença de micronúcleos que são indícios de apoptose;
- v. Verificação da presença de microrganismos, como fungos e bactérias (incluindo micoplasmas); alguns contaminantes podem ser observados ao microscópio óptico, mas são facilmente confundidos com outras sujidades. O ideal é o acompanhamento da cultura com ensaios específicos para detecção de contaminações microbiológicas.

Caracterização da população celular

A caracterização de uma cultura primária é feita pela evidência de uma ou mais características peculiares da população, como expressão de genes, presença de proteínas da membrana plasmática, do citoesqueleto ou de proteínas secretadas, atividade metabólica, capacidade funcional, entre outras. Esses procedimentos podem incluir manipulações laboratoriais complexas e, sempre que possível, o método eleito deve ser o de menor custo e complexidade, desde que resulte em informação satisfatória.

A caracterização populacional faz-se necessária, uma vez que os tecidos são heterogêneos, contendo vários tipos celulares, com a possível exceção da cartilagem. O processo de cultivo *in vitro* é capaz de alterar as características originais das populações celulares primárias. Na medula óssea humana, por exemplo, as MSC representam 0,001%²⁰, enquanto que, no tecido adiposo, 2%²¹. No entanto, após o período de cultivo e expansão *in vitro*, as MSC podem alcançar o percentual > 95%²², independentemente do tecido de origem.

Muitos tipos celulares possuem características que podem ser reconhecidas diretamente por uso de ensaios colorimétricos ou de fluorescência, como os linfócitos e macrófagos. Essas características se definem com uso de anticorpos específicos para as proteínas, lipídeos ou glicoproteínas de membrana geralmente definidos com os *cluster definition* (CD) *antigens*, as proteínas do citoesqueleto ou componentes nucleares, pela presença das atividades metabólicas, ou pela produção *in vitro* da matriz extracelular.

Outros tipos celulares necessitam da combinação de marcadores de exclusão e/ou de métodos para sua caracterização. São exemplos, as células progenitoras hematopoiéticas e as células MSC. Para as MSC, foi estabelecido um consenso entre os pesquisadores para os requisitos mínimos que a cultura celular deve apresentar, os quais foram adotados pela SITC, sendo eles: aderência ao plástico quando mantidas em



condições padrões de cultivo, mais de 95% das células com expressão dos marcadores CD73, CD90, CD105 e não expressão de (< 2%) CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19, e HLA-DR, e capacidade de diferenciação, quando expostas às condições necessárias, em células das linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica²³.

Quantificação celular e determinação do percentual de células viáveis

A citometria de fluxo é atualmente uma técnica amplamente usada na quantificação de células associada com a sua fenotipagem, por agregar exatidão, reprodutibilidade e rastreabilidade. É utilizada em pesquisas clínicas e em ensaios diagnósticos, na quantificação de populações celulares específicas, o que é garantido pela disponibilidade comercial de kits para este fim. O uso associado de marcadores permite, simultaneamente, contar e subdividir as populações celulares em células vivas, mortas, senescentes e apoptóticas. A Anexina V, por exemplo, é uma proteína que possui alta afinidade pelo fosfolípido de membrana celular fosfatidilserina, o qual é exposto nas fases iniciais da atividade de apoptose. Devido a esta característica, a conjugação da Anexina V a um fluorocromo, possibilita sua utilização como marcador para células que estão no início do processo de apoptose. Complementarmente, seu uso associado a corantes de ácido nucleicos, como o iodeto de propídio ou o 7-amino-actinomicina (7-AAD), possibilita a identificação de células na fase avançada de apoptose ou de células mortas. As células com membranas íntegras excluem estes corantes e as membranas danificadas, são permeáveis.

Células coletadas da medula óssea, sangue periférico ou sangue do cordão umbilical e placentário, que expressam o CD34, utilizadas para o transplante de células progenitoras hematopoiéticas, são quantificadas e têm seu percentual de viabilidade determinado por meio da técnica de citometria de fluxo, com uso do marcador de viabilidade celular 7-AAD, seguindo a recomendação da SITC.

No entanto, a contagem manual de células, com uso da câmara de Neubauer (ou hemocitômetro), é o método utilizado, rotineiramente, pelos laboratórios de cultivo celular, por ser um método rápido, de baixo custo, simples e direto²⁴. O uso da câmara de Neubauer, associado ao corante de exclusão Azul de Tripán, permite a obtenção do percentual de células mortas. Portanto, a menos que seja necessária a determinação de células em atividade apoptótica, o uso da câmara de Neubauer e do corante Azul de Tripán permite a obtenção de resultados confiáveis, do número total de células e seu percentual de viabilidade. A acurácia desta técnica está diretamente relacionada ao cuidado do manipulador para o preparo da suspensão celular e diluição da amostra.

Capacidade proliferativa: tempo de duplicação e progressão do ciclo celular

O aumento progressivo do tempo de geração das células normais (ou diploides) cultivadas *in vitro* é esperado, conforme o limite de Hayflick²⁵. As células aumentam seu tempo de geração após

um período ativo de replicação, independentemente de haver outras causas contribuindo para este fato, como a restrição de nutrientes ou a presença de contaminantes. No entanto, este aumento do tempo de geração também ocorre quando as células se encontram em condições insatisfatórias de cultivo. Portanto, para os produtos de terapia avançada a base de células que passam por manipulação extensa, é fundamental a determinação do potencial de proliferação celular. O tempo de geração (G) pode ser calculado com uso da fórmula $G = 3,322 (\log Y - \log I)$, sendo (Y) o valor total de células obtidas com o subcultivo e (I) o valor total de células utilizadas no início da cultura.

Outra forma de acompanhar o estado proliferativo da cultura celular é através da análise da progressão do ciclo celular, por meio do método de Vindelov. Este é um método simples, quantitativo, com rastreabilidade possível, relevante para a comparação de condições de cultivo pela quantificação de células em várias fases do ciclo celular. Utiliza a análise do conteúdo de DNA de células, identificando as paradas em fase de G0/G1, comparando-as com células na fase ativa da duplicação do DNA (fase S), e com as que entraram na fase G2, já com o DNA integralmente duplicado. A quantificação do DNA/célula é feita por citometria de fluxo^{26,27,28}.

Ensaios para determinação do potencial maligno de células cultivadas

Ainda não há consenso científico ou médico sobre o desenvolvimento de tumores em humanos, em consequência do uso de células somáticas humanas normais submetidas ao prolongado cultivo primário *in vitro*. As terapias podem ser categorizadas como seguras, mas as células que passam pela manipulação extensa devem ser monitoradas para detecção de potenciais transformações malignas. Tradicionalmente, é realizado o ensaio de cariótipo, para identificar algum tipo de instabilidade genética²⁹. Este ensaio deve ser considerado de baixa sensibilidade, uma vez que analisa uma pequena quantidade de células e a sua relevância é consequentemente limitada³⁰.

De forma complementar, o ensaio de formação de colônias celulares em *soft agar* é utilizado para a detecção de crescimento clonal de células em gel de agar, que não sustenta a adesão celular. Com exceção de células das linhagens linfó e mielopoiéticas, todas as células humanas normais são dependentes para a sua proliferação de ancoragem num substrato sólido, e não podem formar colônias em *soft agar*. A conversão de células humanas normais em células cancerosas afere a capacidade de crescimento em gel não aderente³¹. Consequentemente, o cultivo em condições clonogênicas de *soft agar* pode ser aplicado a uma amostra relativamente grande de células cultivadas, e a presença de uma única colônia pode ser indicativa da presença de uma célula potencialmente neoplásica.

O resultado positivo do ensaio deve ser verificado pela coleta do clone suspeito e a sua potencial identificação como pertencente às linhagens hematopoiéticas, o que representa um resultado falso-positivo. Uma coloração com os corantes tradicionais para essas células, como o May-Grünwald-Giemsa ou Peppenheim,



é suficiente. Entende-se que na coleta original do tecido a ser cultivado, o sangue do doador pode ter sido introduzido na cultura. Alguma célula normal de linhagens sanguíneas pode ter sido mantida ao longo do cultivo, e ela pode gerar um resultado falso-positivo. Por outro lado, as células cancerosas ocultas endógenas podem também circular no sangue do doador, como as células individuais ou como as micro-metástases³². Elas serão também potencialmente identificadas pelo ensaio de *soft agar*. A sua identificação pode ser importante para uma nova avaliação e revisão da saúde do doador de células, no caso de ausência de informações prévias sobre a presença de um processo neoplásico. Elas serão relevantes também quando uma terapia avançada se dirige, num contexto autólogo, para uma aplicação em procedimentos de tratamento das lesões iatrogênicas associadas ao tratamento prévio de câncer. É o caso de restauração das ablações teciduais extensas, como uma mastectomia, ou tratamento das lesões de difícil cicatrização, como lesões teciduais consecutivas à quimio ou à radioterapia. A detecção de células neoplásicas circulantes nesses casos também pode ser relevante para a revisão da saúde e das intervenções terapêuticas no paciente.

Capacidade funcional

Além da sua capacidade proliferativa que deve garantir a quantidade de células para o seu uso terapêutico, a potencial função de células cultivadas *in vitro*, a serem usadas em terapias avançadas, depende das propriedades relativas à sua origem e da manutenção ao longo do cultivo celular da sua capacidade natural em organização, reparo e regeneração tecidual. A necessidade da determinação da capacidade funcional dos produtos de terapia avançada, contendo as células cultivadas *in vitro*, é unanimidade para todas as agências regulatórias. No entanto, os ensaios não foram definidos, bem como os limites de aceitação para os resultados esperados. Recomenda-se que sejam aplicados os ensaios apropriados ao uso pretendido do produto. São exemplos de ensaios funcionais os da capacidade de diferenciação de células progenitoras nas linhagens osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas, neurogênicas ou hematopoiéticas, os de absorção de antígenos por células dendríticas, entre outros. A interpretação deve ser, entretanto, ponderada em função da origem do tecido e das características das suas ações esperadas no paciente. Um dos exemplos é a já citada recomendação da SITC sobre os ensaios necessários à avaliação das populações de células mesenquimais, propostas para utilização em terapias. Quando expostas às condições específicas, as células mesenquimais devem se diferenciar em células das linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Entretanto, para a aceitação de seu uso específico, devem ser capazes de diferenciar em, pelo menos, duas destas três linhagens²³.

Os Ensaio de Qualidade Celular manipuladas *in vitro*, descritos nas seções anteriores, devem ser realizados sob a responsabilidade do Centro de Processamento Celular, que deve garantir essencialmente a ausência de efeitos potencialmente adversos no paciente em todas as terapias. Por outro lado, as definições das propriedades funcionais de células se dirigem essencialmente à questão da manutenção ou da modificação dos efeitos terapêuticos esperados ao longo do cultivo de células. Consequentemente, a documentação

que acompanha o registro formal de um produto de terapia avançada deve conter a descrição detalhada e completa dos ensaios de controle da capacidade funcional do produto. O Centro de Processamento Celular deve receber e integrar esses ensaios à sua capacidade operacional, já que os mesmos deverão ser realizados paralelamente aos ensaios de qualidade celular, em todos os lotes a serem produzidos e disponibilizados para uso clínico.

Proposta da organização e realização dos ensaios de qualidade e de capacidade funcional de células destinadas às terapias avançadas

Produtos de terapias avançadas, a base de células cultivadas *in vitro*, devem ser preparados de forma padronizada, criteriosa, rastreável e controlada, para garantir a qualidade final, alcançando dois propósitos principais: (1) garantir a qualidade do produto, com a conseqüente segurança do paciente tratado e (2) garantir a possibilidade de alcançar os resultados clínicos e terapêuticos desejados. A concordância de pesquisadores e agências regulatórias sobre este fato resultará em uma definição dos ensaios que devem ser aplicados especificamente para cada uma das categorias de culturas celulares, assim como dos limites de aceitação para seus resultados.

A RDC nº 214/2018 dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e Pesquisa Clínica e se aplica a todos os Centros de Processamento Celular, aptos para a manipulação extensa de vários tipos de células humanas, gerando produtos de terapias avançadas. Essa nova denominação inclui os Laboratórios de processamento de medula óssea e sangue periférico, os bancos de sangue de cordão umbilical e placentário e os centros de tecnologia celular e define as especificidades para o fornecimento de produtos à base de células e aos produtos de terapias avançadas, com objetivo de garantir a qualidade e segurança dos produtos fornecidos para uso terapêutico e pesquisa clínica e minimizar os riscos aos pacientes. Esses produtos compreendem: (1) produtos de terapia celular avançada; (2) produtos de engenharia de tecidos; e (3) produtos de terapia gênica constituídos por ou à base de células. As três categorias serão liberadas para uso somente depois de se analisar, individualmente, cada uma delas, associando as características do produto final com os procedimentos da sua obtenção. Nesse momento, os controles de qualidade específicos para cada um deles serão exigidos, analisados e aplicados. Como as três categorias de produtos contemplam a manipulação de células, a qualidade dessa manipulação será exigida e verificada especificamente para cada caso. Ao longo do desenvolvimento e liberação de novos produtos e dos processos de manipulação associados, essas exigências poderão ser usadas como precedentes para estabelecimento dos parâmetros de qualidade a serem exigidos. Cumulativamente, eles poderão constituir um valioso elenco das qualidades a serem requeridas para garantir os produtos de terapias avançadas, colocados à disposição da população nacional. A consulta pública nº 416/2017, que segue em análise pela Anvisa, trata da regulação de ensaios clínicos, para fins de comprovação de segurança e eficácia, a serem realizados com produtos de terapia avançada investigacionais, passivos de registro, no Brasil, e



exige a manipulação de células e produtos de terapias avançadas em Centros de Processamento Celular autorizados pela Anvisa³³.

Há, atualmente, um consenso de que a potencialidade das células para gerar os benefícios das terapias realizadas com os produtos de terapia avançada depende da quantidade de células disponíveis³⁴. A eficiência terapêutica do produto dependerá das condições com quais as células são expandidas *in vitro* e criopreservadas. Consequentemente, o lote de células a ser usado em uma terapia poderá ser obtido em culturas paralelas ou cumulativas ao longo do tempo, com a sua criopreservação parcial ou global. Cada lote deverá ser submetido aos controles adequados, no momento da sua liberação para o uso. Essa exigência será atendida em três contextos, descritos em seguida.

(I) Recepção, manipulação extensa e expansão de células em cultura primária, até a obtenção da quantidade necessária para o procedimento terapêutico, e a sua liberação para o uso. É o procedimento de terapias celulares autólogas com a expansão básica das células (Figura 1).

(II) Recepção, manipulação extensa e expansão de células em cultura primária, obtenção da quantidade necessária para o procedimento terapêutico, seguida de criopreservação. O lote preservado será usado em um segundo tempo, para atender ao paciente, no momento apropriado para o uso terapêutico, e nos tempos subsequentes, quando podem ocorrer tratamentos repetidos, com uso do mesmo lote de células. Depois do descongelamento, as células serão mantidas em cultivo por tempo limitado, para voltar à viabilidade adequada e para acondicioná-las, adequadamente, com o veículo de administração (Figura 2).

(III) Recepção, manipulação extensa e expansão de células em cultura primária, criopreservação e estocagem das células num *Master Bank* para uso futuro. Sempre quando necessário, um lote do *Master Bank* será descongelado e, novamente, expandido, para ser fornecido para o uso clínico ou para uma nova expansão do *Master Bank*. Nesse caso, cada nova expansão gera um novo lote que deve passar pelos controles de qualidade necessários. É o procedimento mais complexo, que se aplica ao uso de células alogênicas, produtoras de mediadores parácrinos ou associadas com os produtos de bioengenharia (Figura 3).

Em todos os casos, na recepção deve ser realizado o Controle de Qualidade 1 (CQ1), para verificar a presença de contaminantes microbiológicos. Para este ensaio pode ser usada a amostra de veículo utilizado no acondicionamento do material. Uma amostra representativa deve ser guardada para uso futuro, caso necessário.

O Controle de Qualidade 2 (CQ2) é o principal controle de qualidade de células manipuladas e expandidas *in vitro*. Ele será realizado ao longo da expansão primária de células, concluindo-o no momento de sua liberação para uso ou para a criopreservação. Ele é composto da seguinte bateria de exames:

- Contagem das células;
- Capacidade proliferativa;

- Apoptose/Necrose e Ciclo Celular, ambos por citometria de fluxo;
- Caracterização populacional ou Fenotipagem, apropriadas ao produto de terapia avançada;
- Viabilidade celular (azul de tripan);
- Impurezas: inclui a verificação da presença de endotoxinas e outras substâncias ou células que possam ser prejudiciais ao receptor;
- Controle microbiológico (contaminantes fungos, bactérias e micoplasmas);
- Cariótipo e Crescimento celular em *soft agar* (ensaio *in vitro* para detecção de eventual presença de células cancerosas);
- Potência: Ensaio funcional, quando couber, apropriado ao produto final de terapia avançada: a atividade biológica relevante das células, caso conhecida, ou dos produtos sintetizados pela célula deverá ser definida e quantificada. A não realização deste teste deve ser justificada.

No caso I (Figura 1), as células devem ser testadas para a bateria de ensaios de controle de qualidade, acima listada, em passagem anterior à liberação para uso. Caso os resultados não tenham sido liberados, antes do preparo para o uso, o médico responsável deve estar ciente e se responsabilizar pela liberação.

No caso II (Figura 2), as células devem ser testadas para a bateria de ensaios de controle de qualidade, acima listada, em passagem anterior ao processo de criopreservação (antes da adição de crioprotetores); e amostra(s) de células representativa(s) do(s) lote(s) criopreservado(s) deve(m) ser testada(s) para a presença de contaminantes (fungos, bactérias e micoplasmas), contagem de células e viabilidade (com uso de corante de exclusão azul de tripan).

No caso III (Figura 3), as células devem ser testadas para a bateria de ensaios de controle de qualidade, acima listada, em passagem anterior ao processo de criopreservação (antes da adição de crioprotetores); e amostra(s) de células representativa(s) do(s) lote(s) criopreservado(s) deve(m) ser testada(s) para a presença de contaminantes (fungos, bactérias e micoplasmas), contagem de células e viabilidade (com uso de corante de exclusão azul de tripan). Para cada etapa de expansão (expansão do *Master Bank*), as células devem ser, novamente, testadas para os ensaios de controle de qualidade (bateria de ensaios descrita acima) em passagem anterior ao processo de criopreservação (antes da adição de crioprotetores); e amostra(s) de células representativa(s) do(s) lote(s) criopreservado(s) deve(m) ser testada(s) para a presença de contaminantes (fungos, bactérias e micoplasmas), contagem de células e viabilidade (com uso de corante de exclusão azul de tripan).

As Figuras de 1 a 3 apresentam os fluxogramas de processamento do material biológico humano para a obtenção da cultura primária de células e preparo do produto de terapia avançada e indica os pontos de retirada de amostras para a realização dos ensaios de controle de qualidade, para os casos I, II e III, conforme acima descrito.

Na liberação das células para uso, em qualquer das situações, as células preparadas devem ser testadas para a presença de contaminantes

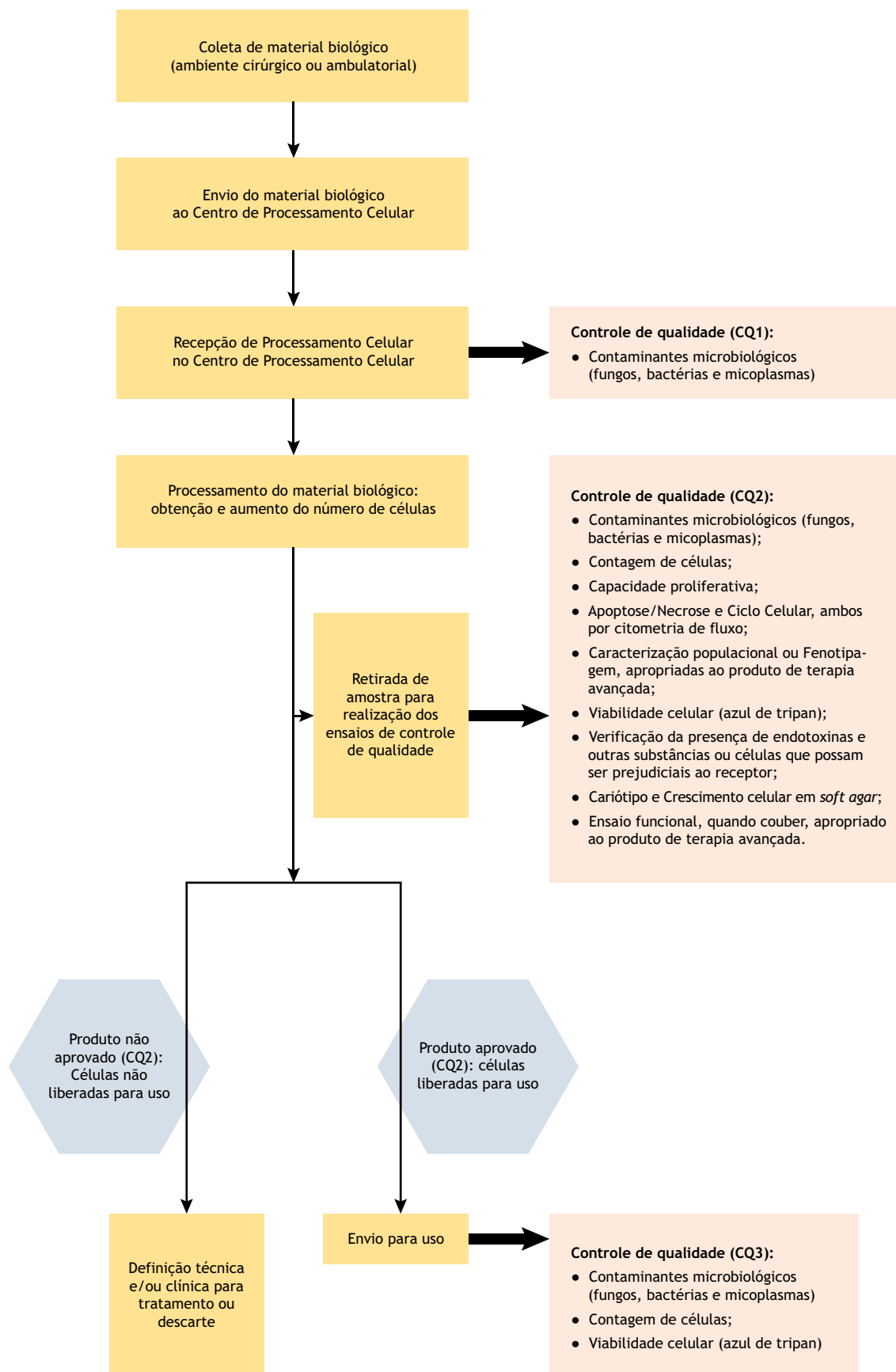


Figura 1. Fluxograma do processamento do material biológico humano, que passa por manipulação extensa, seguida por preparação e envio das células para o uso (caso I); indicação dos pontos de retirada de amostra, para realização dos ensaios de controle de qualidade. CQ: controle de qualidade.

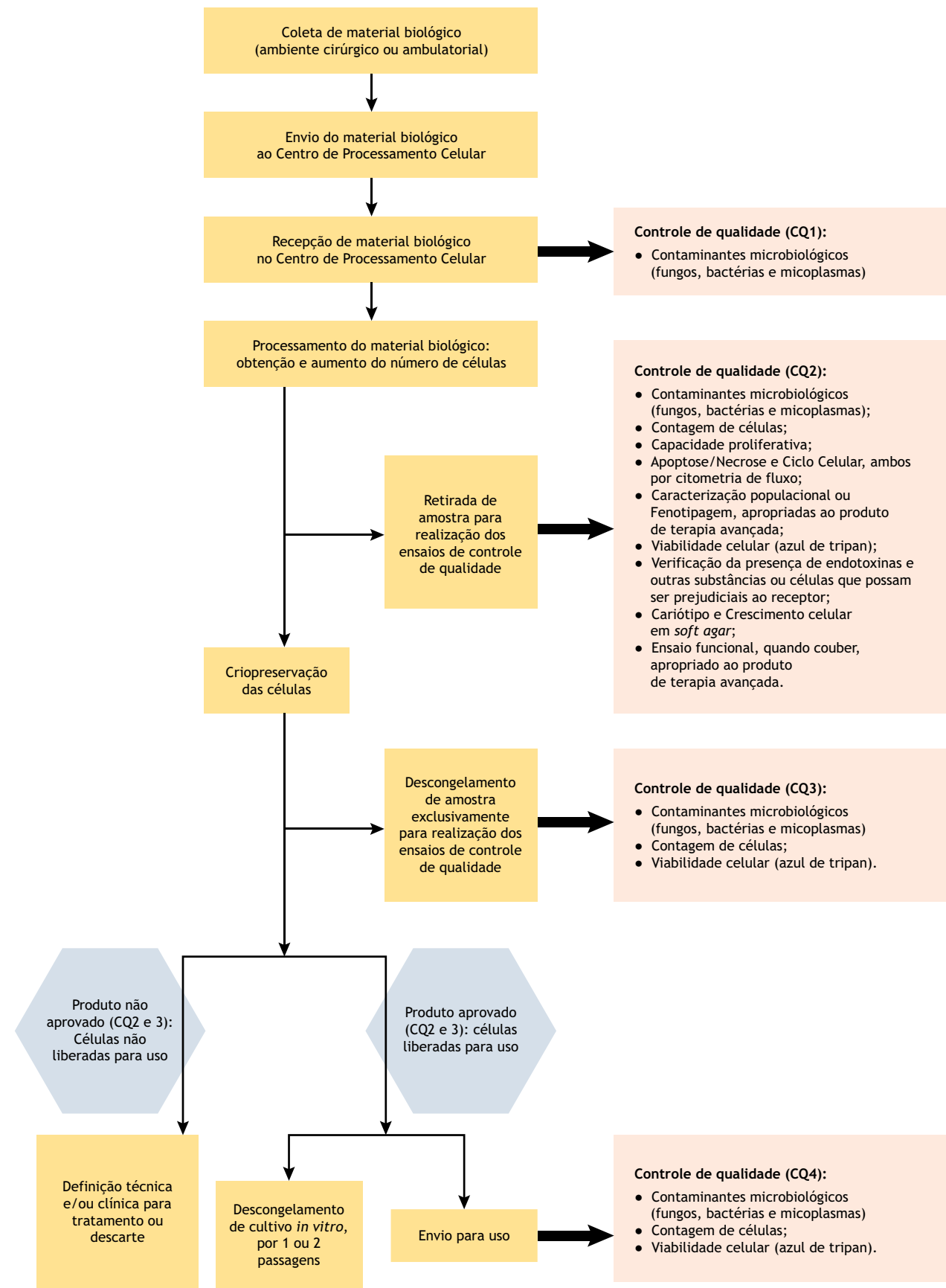


Figura 2. Fluxograma do processamento do material biológico humano, que passa por manipulação extensa, seguida por criopreservação das células, sendo estas células descongeladas, imediatamente, para o uso ou descongeladas, para retorno ao cultivo *in vitro*, por uma ou duas passagens, e então, são preparadas e enviadas para o uso (caso II); indicação dos pontos de retirada de amostra, para realização dos ensaios de controle de qualidade. CQ: controle de qualidade.

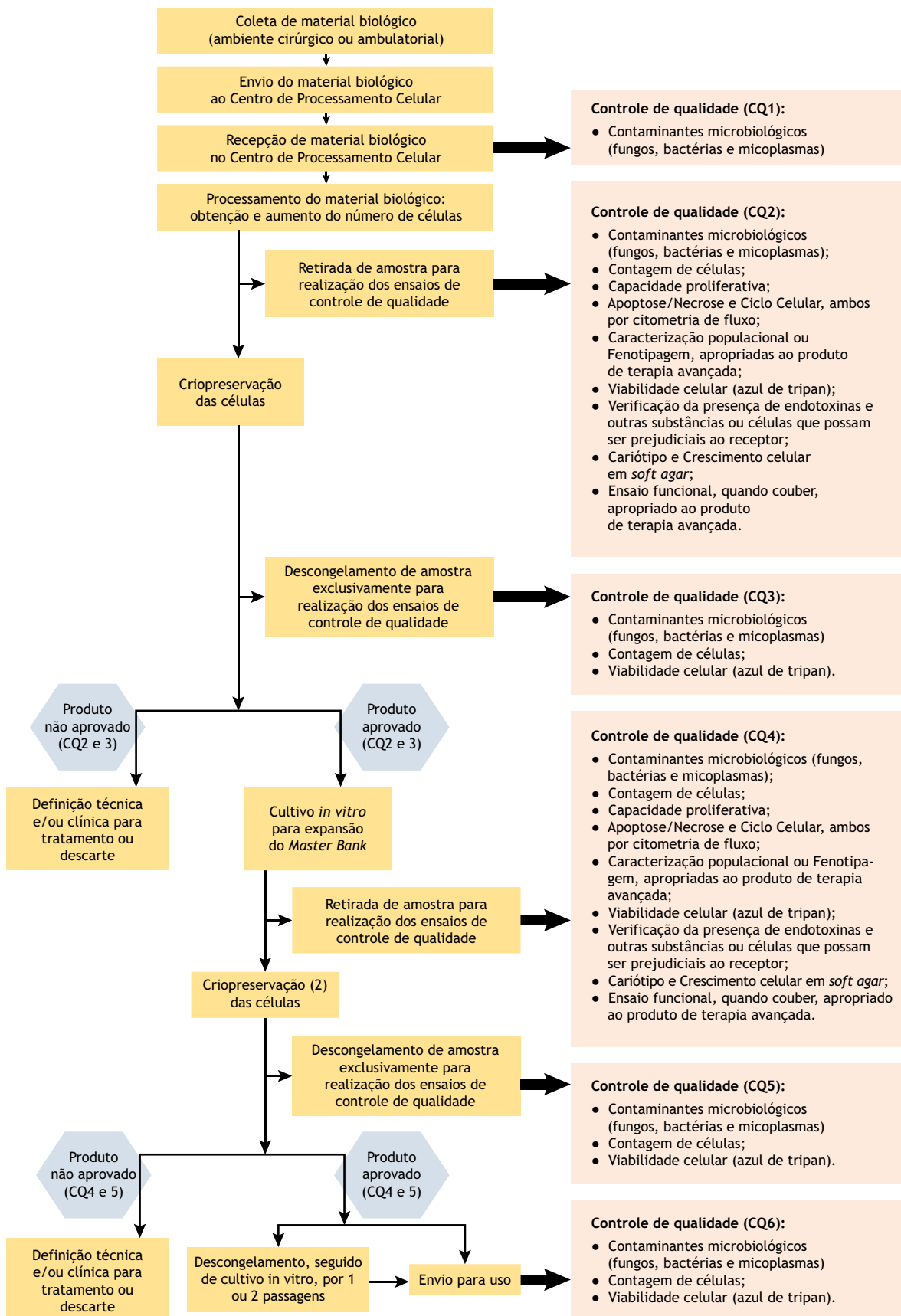


Figura 3. Fluxograma do processamento do material biológico humano, que passa por manipulação extensa, seguida por criopreservação das células, descongelamento e segunda etapa de expansão (expansão do Master Bank), e então, são preparadas e enviadas para o uso (caso III); indicação dos pontos de retirada de amostra, para realização dos ensaios de controle de qualidade. CQ: controle de qualidade.



microbiológicos, fungos e bactérias, além de serem quantificadas e de terem seu percentual de viabilidade determinado.

CONCLUSÕES

A fim de contribuir para a qualidade do produto final, oferecido para o uso do paciente, e favorecer a comparabilidade dos resultados clínicos obtidos com produtos de terapia avançada, que usam as células cultivadas *in vitro*, propomos que estes produtos

sejam preparados na forma de lotes e que estes sejam, necessariamente, controlados para a qualidade, com realização dos ensaios: Contagem das células; Capacidade proliferativa; Apoptose/Necrose e Ciclo Celular; Caracterização populacional ou Fenotipagem, apropriadas ao produto de terapia avançada; Viabilidade celular (azul de tripan); Presença de endotoxinas; Controle microbiológico (contaminantes fungos, bactérias e micoplasmas); Cariótipo e Crescimento celular em *soft agar*; e Ensaio funcional, quando couber, apropriado ao produto de terapia avançada.

REFERÊNCIAS

1. Dominici M, Nichols K, Srivastava A, Weiss DJ, Eldridge P, Cuende N et al. Positioning a scientific community on unproven cellular therapies: The 2015 International Society for Cellular Therapy Perspective. *Cytotherapy*. 2015;17(12):1663-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.007>
2. Bravery CA, Carmen J, Fong T, Oprea W, Hoogendoorn KH, Woda J et al. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy*. 2013;15(1):9-19. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.10.008>
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 214, de 7 de fevereiro de 2018. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 22 fev 2018.
4. Friedenstien AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
5. Soure AM, Fernandes-Platzgummer A, Silva CL, Cabral JM. Scalable microcarrier-based manufacturing of mesenchymal stem/stromal cells. *J Biotechnol*. 2016;236:88-109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.007>
6. Martins JP, Santos JM, de Almeida JM, Filipe MA, de Almeida MV, Almeida SC et al. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):9. <https://doi.org/10.1186/scr398>
7. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005;80(6):836-42. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000173794.72151.88>
8. Kim SJ, Moon GJ, Chang WH, Kim YH, Bang OY. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with early phase stroke serum: current evidence and study protocol for a randomized trial. *Trials*. 2013;14(14):317. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-14-317>
9. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16(2):245-57. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.011>
10. Meneses JV, Fortuna V, de Souza ES, Daltro GC, Meyer R, Minniti CP et al. Autologous stem cell-based therapy for sickle cell leg ulcer: a pilot study. *Br J Haematol*. 2016;175(5):949-55. <https://doi.org/10.1111/bjh.14326>
11. Kon E, Filardo G, Roffi A, Andriolo L, Marcacci M. New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2012;5(3):236-43. <https://doi.org/10.1007/s12178-012-9135-x>
12. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res*. 2003;21(3):420-31. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00163-8](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00163-8)
13. Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(6):838-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.01.011>
14. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*. 2016;25(5):829-48. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
15. Moustafa M, Bullock AJ, Creagh FM, Heller S, Jeffcoate W, Game F et al. Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers. *Regen Med*. 2007;2(6):887-902. <https://doi.org/10.2217/17460751.2.6.887>
16. Macmull S, Jaiswal PK, Bentley G, Skinner JA, Carrington RW, Briggs TW. The role of autologous chondrocyte implantation in the treatment of symptomatic chondromalacia patellae [SICOT]. *Int Orthop*. 2012;36(7):1371-7. <https://doi.org/10.1007/s00264-011-1465-6>
17. Food and Drug Administration - FAO. 69 FR 29786. Final rule: eligibility determination for donors of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products. 25 maio 2004[acesso 7 jan 2018]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/rules/suitdonor.pdf>
18. Arnold DM, Neame PB, Meyer RM, Soamboonsrup P, Luinstra KE, O'Hoski P et al. Autologous peripheral blood progenitor cells are a potential source of parvovirus B19 infection. *Transfusion*. 2005;45(3):394-8. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.04267.x>



19. Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol.* 1997;53(3):229-32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199711\)53:3<229::AID-JMV8>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199711)53:3<229::AID-JMV8>3.0.CO;2-A)
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
21. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105> PMID:12475952
22. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. *BMC Cell Biol.* 2014;15(1):46. <https://doi.org/10.1186/s12860-014-0046-0>
23. 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>
24. Ng KW, Leong DT, Hutmacher DW. The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):182-91. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.182>
25. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965;37(3):614-36. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
26. Jackson AR, Shah A, Kumar A. Methamphetamine alters the normal progression by inducing cell cycle arrest in astrocytes. *PLoS One.* 2014;9(10):e109603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109603>
27. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2004;281:301-11. <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301>
28. Vindeløv L, Christensen IJ. An integrated set of methods for routine flow cytometric DNA analysis. *Methods Cell Biol.* 1990;33:127-37. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60519-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60519-1)
29. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* 2007;67(19):9142-9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4690>
30. Guess AJ, Daneault B, Wang R, Bradbury H, La Perle KM, Fitch J et al. Safety profile of good manufacturing practice manufactured interferon γ -primed mesenchymal stem/stromal cells for clinical trials. *Stem Cells Transl Med.* 2017 6(10):1868-79. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0485>
31. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol.* 2012;226(2):380-93. <https://doi.org/10.1002/path.3000>
32. Nicola MH, Bizon R, Machado JJ, Sollero T, Rodarte RS, Nobre JS et al. Breast cancer micrometastases: different interactions of carcinoma cells with normal and cancer patients' bone marrow stromata. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(5):471-9. <https://doi.org/10.1023/A:1025462417256>
33. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Consulta Pública Nº 416, de 8 de novembro de 2017. Dispõe sobre "Procedimentos e requisitos regulatórios para a realização de ensaios clínicos com Produtos de Terapias Avançadas Investigacionais passíveis de registro no Brasil. Diário Oficial União. 9 nov 2017.
34. Bunpetch V, Wu H, Zhang S, Ouyang H. From "bench to bedside": current advancement on large-scale production of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2017;26(22):1662-73. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0104>

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.

A importância do controle de qualidade de culturas utilizadas em ensaios biológicos e no desenvolvimento de pesquisas na área de saúde

The importance of quality control of cultures used in biological assays and in research development in the health area

RESUMO

Aurea Valadares
Folgueras-Flatschart
Bruno Cosme Gomes
Fernanda Leve
Leonardo da Cunha Boldrini*

Introdução: Avanços na pesquisa científica baseiam-se nas descobertas previamente publicadas. Entretanto, há preocupação com a falta de reprodutibilidade nas pesquisas biológicas das áreas básica e pré-clínica, em função da repercussão na saúde da população. Como células cultivadas in vitro constituem a base para muitos estudos toxicológicos e terapêuticos, a preocupação com a qualidade destas torna-se primordial. Com relação aos contaminantes microbiológicos, embora bactérias e fungos sejam facilmente reconhecidos, vírus e micoplasmas são invisíveis na microscopia óptica. Outro problema delicado seriam os resultados gerados com células com identidade modificada. **Objetivo:** Discutir as principais metodologias para a garantia da qualidade de células utilizadas em ensaios in vitro e demonstrar como algumas coleções mundiais estão estruturadas para tratar esta questão. **Método:** Levantamento da literatura científica nas bases de dados PubMed e Scielo e na página da web de diferentes coleções biológicas até dezembro de 2017. **Resultados:** Recomenda-se a aplicação das seguintes técnicas para detecção de contaminantes em cultivos celulares: 1) vírus: o PCR e o isolamento viral; 2) micoplasmas: o PCR, a bioluminescência e a coloração das células com fluoróforo com afinidade ao DNA; 3) identidade de células humanas: o STR; 4) identidade de células não humanas: o Barcode. **Conclusões:** Considerando todo o investimento aplicado em pesquisa científica em âmbito mundial, o desenvolvimento de novas metodologias alternativas ao uso de animais e o consenso crítico do conceito de qualidade, conclui-se que qualquer laboratório deve garantir o controle de pureza e autenticidade de suas linhagens.

PALAVRAS-CHAVE: Linhagens Celulares; Pureza; Autenticidade; Reprodutibilidade

ABSTRACT

Introduction: Advances in scientific research are based on previously published findings. However, there is concern about the lack of reproducibility in the biological researches in basic and pre-clinical areas, due to the repercussion on the population's health. Because in vitro cultured cells are the basis for many toxicological and therapeutic studies, concern about their quality becomes paramount. Regarding microbiological contaminants, although bacteria and fungi are easily recognized, viruses and mycoplasmas are invisible under light microscopy. Another delicate issue would be the results generated with cells with modified identity. **Objective:** To discuss the main methodologies for assuring the quality of cells used in in vitro assays and to demonstrate how some world collections are structured to address this issue. **Method:** The scientific literature in the PubMed and Scielo databases and the webpage of different biological collections until December 2017. **Results:** It is recommended to apply the following techniques to detect contaminants in cell cultures: 1) virus : PCR and viral isolation; 2) mycoplasmas: PCR, bioluminescence and staining of cells with DNA affinity fluorophore; 3) human cell identity: the STR; 4) non-human cell identity: the Barcode. **Conclusions:** Considering all the investment applied in scientific research worldwide, the development of new methodologies alternatives to the use of animals and the critical consensus of the concept of quality, it is concluded that any laboratory should guarantee the control of purity and authenticity of its lineages.

KEYWORDS: Cell Lines; Purity; Authenticity; Reproducibility

Instituto Nacional de Metrologia,
Qualidade e Tecnologia (Inmetro),
Duque de Caxias, RJ, Brasil

* E-mail: lcboldrini@inmetro.gov.br

Recebido: 05 nov 2017

Aprovado: 15 jan 2018



INTRODUÇÃO

Os avanços na pesquisa baseiam-se na reprodutibilidade de dados e nas descobertas previamente publicadas. Por este motivo, há crescente preocupação com a falta de reprodutibilidade na pesquisa em geral, mais especialmente na biológica básica e pré-clínica, em função da repercussão na saúde da população. Na área de ciências da vida, temos como um dos mais importantes contribuintes para a falta de reprodutibilidade o uso de linhagens celulares isoladas de diferentes fontes humanas identificadas incorretamente (contaminação cruzada intra e interespécies) ou contaminadas por microrganismos como os micoplasmas^{1,2}. A falta de reprodutibilidade afeta um importante ponto da experimentação científica, pois, se experimentos não podem ser reproduzidos, eles não são úteis de forma alguma, implicando, no final, em desperdício de tempo e dinheiro.

O cultivo de células vem se desenvolvendo exponencialmente desde o século XIX a ponto de, na atualidade, células cultivadas *in vitro* servirem como ferramentas terapêuticas^{3,4,5}, modelos para estudo dos mais variados fenômenos e processos biológicos^{6,7,8,9} e estudos toxicológicos^{10,11,12,13,14}, entre outras aplicações. Ainda no contexto de cultivo celular e suas aplicações, é inegável a contribuição dos estudos *in vitro* na ciência regulatória, para a avaliação e registro de produtos. Estes estudos devem atender elevados critérios de qualidade visando a obtenção de resultados confiáveis e com reprodutibilidade aceitável.

Uma pesquisa recente realizada pelo grupo *Nature*¹⁵ revelou atitudes contraditórias dos pesquisadores em relação à falta de reprodutibilidade, pois, embora mais da metade dos cientistas concordem com este problema, apenas cerca de 30% reconhecem que esta se deva a dados errados. De fato, muitos consideram que os fatores mais importantes para a falta de reprodutibilidade são a competição e pressão para publicar, seguidos por pobre análise estatística e desenho experimental, entre outros fatores. Apenas um terço dos respondentes informaram estratégias para melhorar a reprodutibilidade (repetindo o estudo ou solicitando a outra pessoa para fazê-lo).

Por exemplo, na área da Biologia do Câncer, a iniciativa chamada *Reproducibility Project: Cancer Biology* (<https://elifesciences.org/collections/9b1e83d1/reproducibility-project-cancer-biology> - verificado em 24/10/2017), liderada pelo *Center for Open Science* (<http://centerforopenscience.org/> - verificado em 24/10/2017) e *Science Exchange* (<https://www.scienceexchange.com/> - verificado em 24/10/2017), visa replicar de forma independente os resultados selecionados de uma série de artigos de alto nível no campo da Biologia do Câncer. Antes da coleta de dados do estudo a ser replicado, o desenho experimental e os protocolos são revisados por pares e publicados; em seguida, os resultados são publicados como *Replication Study*.

A despeito desta estratégia ser interessante, pode-se buscar, inicialmente, a prevenção de falhas nos estudos *in vitro* atentando-se para dois importantes fatores: a autenticidade das células utilizadas no estudo e a ausência de contaminação microbiológica. Em outras palavras, é preciso implementar

rotinas para o controle de qualidade de linhagens celulares utilizadas na pesquisa científica¹⁶. Recentemente demonstrou-se que as fontes mais comuns de erro no laboratório que levaram a retratações são a contaminação (microbiológica e identificação incorreta) e os erros analíticos¹⁷. Assim, o objetivo desta revisão é apresentar o estado da arte quanto ao impacto de contaminantes microbiológicos e da autenticidade de células na pesquisa na área da saúde.

MÉTODO

Este estudo, elaborado como uma revisão integrativa, foi conduzido segundo metodologia descrita previamente¹⁸, pelo levantamento de artigos científicos entre 03 de julho e 30 de outubro de 2017, com o objetivo de tratar dos principais aspectos da qualidade de células e seu impacto na reprodutibilidade da pesquisa científica. A elaboração deste artigo contou com as seguintes etapas: 1) apresentar ao leitor os principais contaminantes microbiológicos em cultivos de células de mamíferos; 2) discutir a importância da autenticação da identidade das linhagens celulares em ensaios laboratoriais; 3) verificar, nas páginas da *web* de diferentes coleções biológicas do mundo, como a informação de controle de qualidade associada ao material biológico comercializado está disponível. O levantamento de literatura científica foi realizado por consulta às bases de dados PubMed e SciELO, empregando palavras-chave como: técnicas de cultivo celular/métodos, controle de qualidade, reprodutibilidade dos resultados, autenticidade celular, micoplasma, contaminação celular. Foram incluídos artigos publicados em inglês e português, sem restrição de ano de publicação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contaminantes microbiológicos em cultivo de células de mamíferos

Os contaminantes microbiológicos mais comumente encontrados nas células são micoplasmas, vírus, bactérias e leveduras. Na maioria dos casos, as contaminações por bactérias e fungos são facilmente reconhecidas e, não sendo possível o descarte dessas culturas, elas são passíveis de tratamento com antibióticos. Entretanto, a contaminação com micoplasmas e vírus muitas vezes passa despercebida pois eles são invisíveis na observação direta ao microscópio óptico e nem sempre causam alterações na morfologia das células. Mesmo assim, podem ocorrer alterações como redução da taxa de crescimento, alterações cromossômicas ou no metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos. Por estes motivos, a contaminação das células em cultura pode colocar em dúvida os resultados de ensaios *in vitro*, provocando atrasos, perda financeira e requerendo esforços para sua detecção e eliminação, quando possível¹⁹.

No caso das contaminações que acontecem por micoplasmas, o tratamento das culturas celulares é possível usando um ou mais antibióticos associados em protocolos *in house* ou mesmo produtos comerciais para este fim específico. Entretanto, é possível



que as células selecionadas ao final do tratamento apresentem algumas diferenças em relação à cultura original²⁰. Assim, é recomendável que, após submetida a este processo de descontaminação, as culturas tenham seu desempenho avaliado nos ensaios específicos em que serão utilizadas. Por este motivo, sempre que possível, recomenda-se dar preferência ao descarte da cultura contaminada e substituição por lote previamente testado, livre de micoplasmas. Já em casos de contaminações virais, este descarte é a única opção, pois não há forma efetiva de descontaminação.

Além das células que deram origem às culturas (linhagens celulares ou culturas primárias), outros insumos de origem animal utilizados na manutenção de culturas de células, tais como o soro fetal bovino (SFB) e a tripsina, podem ser a fonte de vírus ou micoplasmas contaminantes das culturas, assim como o uso de procedimentos inadequados de manuseio. Por suas consequências ou pela dificuldade (ou mesmo impossibilidade) do processo de descontaminação, a prevenção das contaminações microbiológicas é a melhor solução para este problema. Para isto, o monitoramento periódico de possíveis contaminantes em culturas celulares e seus insumos é essencial para a manutenção da qualidade das culturas celulares e garantia de confiança nos resultados dos ensaios *in vitro*.

No Brasil, Oliveira et al. trabalharam no desenvolvimento de metodologia para a detecção por reação em cadeia da polimerase (PCR) de alguns agentes adventícios como micoplasmas, circovírus porcino 1 (PCV1), vírus da diarreia viral bovina (BVDV)¹⁹ e o parvovírus suíno (PPV)²¹ e fizeram o levantamento destas contaminações em 88 culturas celulares, 13 amostras de soro fetal bovino e dez amostras de tripsina utilizados em oito laboratórios veterinários brasileiros (de rotina ou de pesquisa). Os resultados mostraram a ocorrência das seguintes taxas de contaminações das células: 34,1% com micoplasma, 35,2% com PCV1, 23,9% com BVDV e em mais de 50% com PPV. Genoma do BVDV foi detectado em duas amostras de SFB e do PCV1 em uma amostra de tripsina. Estes resultados demonstraram que a cultura celular, soro e tripsina utilizados por diferentes laboratórios mostram uma alta taxa de contaminantes. Vale destacar entre os resultados que: o DNA do micoplasma foi detectado em células de todos os laboratórios, o RNA do BVDV em metade deles e apenas 4,5% das culturas celulares analisadas foram negativas para a detecção de qualquer um dos contaminantes pesquisados. Os resultados são atribuídos à prática comum de troca de amostras de células entre laboratórios e ao uso de SFB ou tripsina sem avaliação prévia de possíveis contaminantes. Os autores evidenciam a necessidade do controle de contaminantes biológicos em laboratórios e bancos de células.

Para a detecção de micoplasmas, o método clássico é o de cultivo em meios específicos e, mesmo no Brasil, já era há muito sugerido como rotina nos laboratórios de culturas de células²². Entretanto, além de ser uma técnica demorada, por questões técnicas e de biossegurança, esta atividade requer pessoal experiente e instalações especiais²³. Ainda, como nem todos os micoplasmas são facilmente cultiváveis, alguns casos de contaminação podem passar despercebidas. Ao microscópio eletrônico os micoplasmas podem ser vistos no interior das células ou mesmo na superfície

da membrana celular, mas também requer equipamentos de alto custo e pessoal especializado. Assim, na prática, outros métodos são utilizados na rotina. A marcação de DNA das células fixadas em lâmina com corantes fluorescentes²⁴ é um destes métodos. Em células saudáveis o corante é visto ao microscópio óptico de fluorescência apenas no núcleo das células, mas nas células contaminadas por micoplasmas, o corante pode ser visto também pontilhando o citoplasma ao marcar o DNA deste parasita intracelular (a Figura 1 mostra a detecção de micoplasmas por DAPI). Já os testes enzimáticos, capazes de indicar no sobrenadante da cultura de células a presença de enzimas específicas dos micoplasmas, são bastante específicos e kits comerciais estão disponíveis para este fim. Kazemiha et al. comparam alguns métodos de detecção de micoplasma e indicaram o ensaio bioquímico como substituto do cultivo de micoplasmas²⁵. Em nosso laboratório, foi possível atingir no ensaio bioquímico sensibilidade equivalente a uma PCR². Este ensaio molecular, a PCR, atrai muita atenção porque é rápido, robusto e altamente sensível¹⁹, existindo comercialmente kits de PCR e qPCR e várias metodologias publicadas. Idealmente, o resultado de contaminação de uma cultura celular por micoplasma deve ser confirmado apenas com o resultado positivo em duas destas técnicas.

Para a detecção de contaminantes virais, o método clássico procura fazer o isolamento viral colocando uma alíquota do sobrenadante/lisado da cultura ou o insumo a ser testado sobre uma cultura de células susceptíveis sabidamente livres de contaminantes. Assim, a presença de vírus pode ser detectada por alterações morfológicas nessas células (efeito citopático) e/ou evidenciada com o uso de anticorpos antivirais marcados ou outros testes sorológicos ou moleculares. Esta metodologia, que depende da capacidade de multiplicação do vírus contaminante nas células susceptíveis, é a única cujo resultado positivo confirma diretamente a presença de partículas virais viáveis e, por este motivo, o isolamento viral é mandatório pelo *Food and Drug Administration* para a detecção de vírus em SFB (9 CFR 111.47)

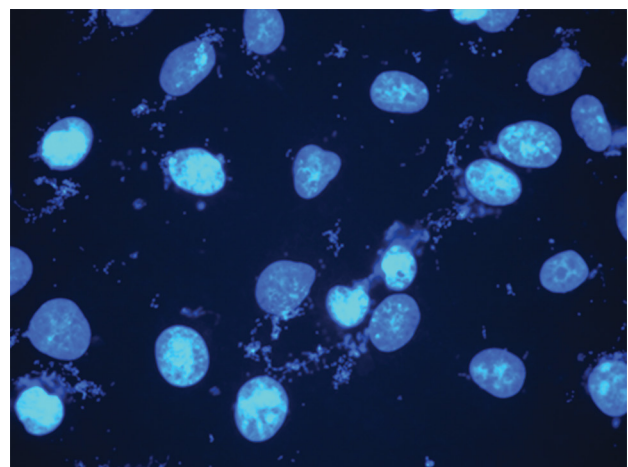


Figura 1. Células em monocamada contaminadas por micoplasmas e coradas com DAPI. São observados os núcleos corados, pela marcação do DNA e também o DNA dos micoplasmas presentes no citoplasma ou membrana das células, dando o típico aspecto de "céu estrelado". Foto gentilmente cedida pelo Dr. Alberto Fraile-Ramos.



como o BVDV e parvovírus, entre outros²⁶. Além do isolamento, a realização extensiva de outros testes para agentes virais específicos é recomendada²⁷. Alguns destes podem detectar a presença de vírus, ou partes deles, buscando por atividades específicas (como hemaglutinação) ou a reatividade com anticorpos específicos (como vírus neutralização e imunoenaios). Já os testes moleculares detectam o DNA ou RNA viral por PCR ou RT-PCR, respectivamente. Para todos existem na literatura métodos e também kits comerciais que avaliam a presença de diversos vírus para este fim. A busca destes agentes adventícios pode ser trabalhosa, pois cada ensaio costuma detectar um tipo viral apenas. Por este motivo, não sendo possível a implantação de métodos validados no laboratório, recomendamos pelo menos a aquisição de insumos previamente testados e pedimos especial atenção aos detalhes dos ensaios incluindo a especificidade de cada um e o limite de detecção do teste. Estas informações não costumam estar facilmente disponíveis ao consumidor, mas são essenciais para a avaliação e comparação entre produtos²⁸. No caso da implantação no laboratório dos ensaios de detecção viral, estas informações são importantes também para a escolha do método, além da validação para o uso em cultura de células, pois pode haver efeito de matriz que altere a eficiência de kits de uso veterinário aplicados para esta atividade²¹.

Na maioria dos métodos descritos acima há a busca específica de determinado contaminante, desta forma, agentes não pesquisados ou desconhecidos não serão identificados. Para superar este viés, alguns autores têm sugerido que a metagenômica por sequenciamento de próxima geração (sequenciamento paralelo massivo) como metodologia imparcial para detectar vírus e outros agentes em soros e outros tecidos de animais. Usando metodologia Illumina (Illumina, San Diego, CA, EUA), Sadegui et al.²⁶ identificaram novos vírus em SFB e avaliaram que eles poderiam ter o potencial de contaminar culturas de células. Toohey-Kurth et al.²⁷ descreveram a aplicação de métodos metagenômicos (MiSeq, Illumina, San Diego, CA, EUA) para a detecção de vírus em soros bovinos obtidos a partir de fontes comerciais. Foram pesquisados 26 soros comerciais de 12 fabricantes independentes nos EUA, Austrália e Nova Zelândia, incluindo 20 SFB, e detectadas sequências de nove famílias virais e mais quatro vírus desconhecidos. A técnica foi tão sensível quanto uma RT-qPCR (reação de PCR quantitativo após transcriptase reversa), variando o número de vírus de 0-11 entre amostras e de 1-11 entre fornecedores, com apenas um produto de um fornecedor sendo inteiramente “limpo”. Os autores consideram que estas descobertas ilustram que confiar em painéis de testes específicos para vírus conhecidos (embora isso possa atender aos requisitos regulatórios) é inadequado para abordar o alcance completo do problema biológico. No futuro, espera-se que a metagenômica possa ser uma ferramenta qualitativa e quantitativa para o controle de qualidade de produtos biológicos derivados de soro, o próprio soro e, porque não, de culturas celulares.

Enquanto estas novas tecnologias não estão disponíveis para o controle de qualidade de culturas celulares e seus insumos, vão merecer nossa máxima atenção à qualidade das células que manipulamos no laboratório e dos produtos para cultura celular

que a ele chegam. Além disso, acreditamos que deve haver um maior esforço para melhorar as diretrizes e regulamentos para as atividades que envolvem culturas celulares.

Como exemplo desta iniciativa, observamos que vários protocolos preconizados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE - www.oecd.org) para métodos alternativos ao uso de animais, que utilizam linhagens celulares, exigem que as mesmas sejam testadas quanto à presença de contaminação por micoplasmas: (i) Método OECD TG 129 - Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica ([http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en)); (ii) Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264071162-en>); (iii) Método OECD TG 439 - Teste de Irritação Cutânea *in vitro* (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264242845-en>); (iv) Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264185401-en>); (v) Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro* (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264091016-en>); (vi) Método OECD TG 491 - Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264242432-en>). Vale ressaltar que, no Brasil, os métodos acima são reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), a partir das Resoluções Normativas nº 18, de 24 de setembro de 2014 e nº 31, de 18 de agosto de 2016. Com a publicação da RDC nº 35, de 07 de agosto de 2015, a Anvisa formalizou sua aceitação sobre os métodos alternativos de experimentação animal listados nas resoluções supracitadas, com substituição total do uso de animais para os desfechos relativos a estas metodologias a partir de 2019.

Autenticação de linhagens celulares humanas e não humanas

As linhagens celulares são o modelo mais utilizado em pesquisas biomédicas e na produção de produtos biológicos. A primeira linhagem estabelecida em 1952 foi extraída de uma paciente com câncer cervical (Henrietta Lacks) e, em homenagem a ela, a linhagem foi nomeada como HeLa²⁹. O modelo logo ganhou popularidade e novas linhagens foram estabelecidas, como, por exemplo a BT-20, a primeira linhagem proveniente de câncer de mama³⁰, e a MCF-7, também representativa de tumor mamário, porém metastático e isolado a partir de efusão pleural³¹.

No final dos anos 1950, surgiu o primeiro relato de identificação errônea/contaminação de uma linhagem celular. O caso foi descrito por Rothfels et al.³² em 1958. Desde então governos e institutos de pesquisa buscam dar visibilidade e combater o problema. Em 1962, foi criado o banco de células autenticadas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (www.atcc.org) que testava todas as culturas celulares de origem humana e não humana por cariotipagem (padrão de bandas cromossômicas) ou por eletroforese de isoenzimas (técnica que permitiu a verificação da autenticidade celular em larga escala^{33,34,35,36}).

A cariotipagem foi a primeira técnica que permitiu a identificação de uma linhagem celular contaminada. Trata-se de uma



metodologia bem estabelecida e descrita em guia harmonizado³⁷ como teste *in vitro* a ser realizado para testar químicos para análise de aberrações cromossômicas de mamíferos. O método parte do princípio de que cada espécie apresenta um conjunto único de cromossomos e por isso tem sido utilizado na identificação de espécies de culturas primárias. Já na análise de linhagens celulares, a cariotipagem pode ser bastante complicada, uma vez que linhagens cultivadas por longos períodos de tempo estão sujeitas a diferentes condições experimentais e podem ser geneticamente instáveis, gerando heterogeneidade celular. De fato, a cariotipagem permite uma visualização geral do genoma e que seja feita a identificação de espécie de origem, dentro de um enorme espectro de espécies, utilizando uma mesma metodologia. No entanto, porque a cariotipagem se baseia na contagem e na análise estrutural dos cromossomos, o método é extremamente trabalhoso e com análise demorada, requerendo ao menos o espalhamento de 20 metáfases, mas usualmente entre 50-100, o que muitas vezes ainda é insensível na detecção de células contaminantes. Embora as análises padrão de células metafásicas podem não ter sensibilidade para detectar contaminação cruzada³⁸, podem determinar gênero, ploidia e estabilidade genética, mas de forma não muito precisa³⁹. Alguns sistemas automatizados que utilizam marcadores para cada cromossomo tornaram a técnica menos laboriosa, no entanto, de custo mais elevado⁴⁰. Assim, com o desenvolvimento de métodos mais rápidos, precisos e menos trabalhosos, o uso da cariotipagem para a autenticação de linhagens celulares, especialmente de origem humana, foi drasticamente reduzido, embora ainda útil em algumas situações pontuais, além de ampla utilização em outras aplicações como em diagnóstico.

Resumidamente, a análise de isoenzimas detecta polimorfismos de enzimas citosólicas por alteração em sua mobilidade eletroforética, que permitem discriminar linhagens celulares de diferentes espécies animais⁴¹. No entanto, as limitações da técnica incluem desde a correta escolha do conjunto de enzimas a serem analisadas até a dificuldade de interpretação dos resultados e de se encontrar kits comerciais para este ensaio. Ainda, técnicas baseadas em análise de DNA tendem a ser mais rápidas, mais baratas e mais sensíveis que aquelas baseadas em proteínas, o que fez com que a metodologia também tenha sido substituída por novas. A Tabela 1 sumariza as principais técnicas utilizadas em autenticidade de células humanas e não humanas, apresentando uma breve descrição dos princípios de cada metodologia bem como de suas aplicações.

Atualmente, a técnica recomendada para a genotipagem de linhagens celulares humanas é o perfil de *Short Tandem Repeat* (STR) (Figura 2), focado no uso de nove *loci* além da amelogenina (identificação sexual), com alguma variação entre diferentes bases de dados. Hoje, os marcadores escolhidos são: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D21S11, vWA, TH01, Amelogenina, TPOX, CSF1PO⁴².

É interessante destacar que, embora a análise de STR possa, em teoria, ser usada para a identificação de todas as espécies animais, atualmente o uso desses marcadores em bancos celulares

é específico para humanos e poucas iniciativas tentam aplicar essas metodologias em outras espécies⁴³. Como consequência, pouco é conhecido sobre o nível de erro na identificação de linhagens celulares animais bastante utilizadas na indústria, incluindo a produção de proteínas recombinantes, vacinas e outros produtos biológicos³⁸ e de contaminação interespecie. Embora *primers* para STR de camundongos estejam disponíveis, seu uso permanece um desafio uma vez que muitas linhagens celulares de camundongo são derivadas de um mesmo indivíduo, portanto indistinguíveis. Além disso, seria necessário desenvolver *primers* para todas as espécies com uso comercial, ou seja, identificar STR polimórficos confiáveis para discriminação intraespécie incluindo a participação de muitos laboratórios coletando dados de STR para a mesma linhagem celular a fim de se construir um consenso na identificação. Em conclusão, os ensaios de Barcode, cariotipagem por bandeamento G e análise de marcadores de superfície ainda são os métodos de escolha para caracterização de células não-humanas, por exemplo, conforme recentemente divulgado em um estudo que caracterizou um erro de identificação em uma linhagem celular de rato, a RGC-5⁴⁴.

Os *loci* de STR são regiões do genoma com conjuntos de nucleotídeos repetidos sequencialmente. Os STR variam de dois a sete nucleotídeos por unidade de repetição e costuma-se utilizar os *loci* de STR com quatro ou cinco nucleotídeos por repetição. Quanto menor é esse número menor será o fragmento total aumentando a probabilidade de sucesso para analisar DNA degradado (maioria das amostras forenses), contudo STR com dois ou três nucleotídeos por repetição costuma gerar mais artefatos que são inerentes à técnica, por esse motivo a melhor relação entre o menor tamanho de fragmento com menos artefatos são os STR com quatro ou cinco repetições^{45,46}.

O número de repetições é o alelo e pode ser igual ou diferente entre os indivíduos de uma população. Existem muitas centenas de *loci* de STR para humanos distribuídos em todos os cromossomos, o número de alelos possíveis (ou repetições) é finito e cada alelo possui uma frequência dentro da população e dos demes. Com base nessas características, foram selecionados 13 *loci* de STR (é comum referir-se, neste caso, ao *locus* gênico como marcador genético) para serem utilizados na identificação humana e investigação de paternidade dentro das ciências forenses. Por conta disso uma grande quantidade de material empírico foi gerada e disponibilizada por universidades, centros de pesquisa, perícia forense e empresas particulares^{47,48,49}.

Este investimento gerou um impacto positivo no desenvolvimento de equipamentos, procedimentos, validação e por consequência um amadurecimento do conhecimento da técnica tornando-a mais robusta, reprodutível, passível de automatização, relativamente barata e com inúmeros kits comerciais já validados disponíveis. Além disso, não é preciso um grande conhecimento técnico para executar o ensaio. Desta forma, foi a metodologia escolhida pela comunidade científica e implementada na norma ANSI/ATCC SDOW ASN-0002:2011^{33,35,42,50} que apresenta um processo compreensível para a execução do ensaio, incluindo requisitos relacionados à qualidade do ensaio.

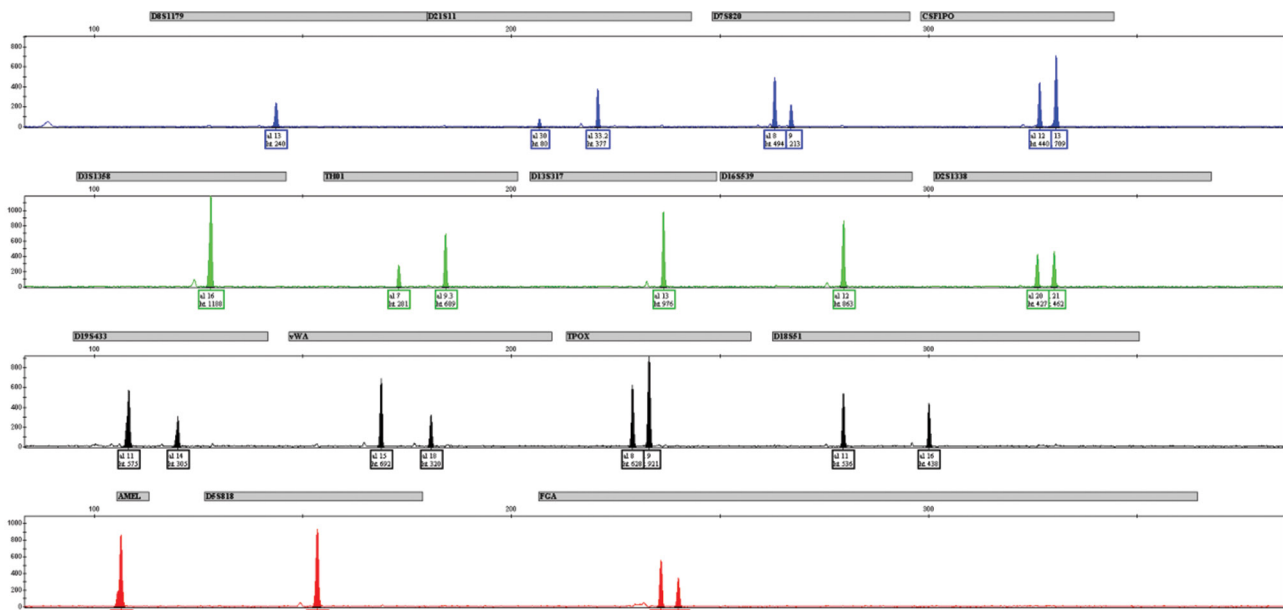


Figura 2. Perfil de STR. A figura representa um eletroferograma interpretado por um *software* específico. Os retângulos cinzas possuem o nome do marcador escrito e delimitam o intervalo de alelos conhecidos. Os picos representam os alelos (número de repetições), quanto mais à direita maior o tamanho do fragmento, conseqüentemente maior o número de repetições. Cada marcador (*locus* gênico) pode ter um pico (homozigoto) ou dois picos (heterozigoto), haja vista, que os humanos são diploides, um pico representa o alelo presente no cromossomo que herdou do pai e o outro pico o alelo no cromossomo que herdou da mãe. Em condições normais, o marcador que apresentar apenas um pico significa que ambos os cromossomos possuem o mesmo alelo. Para os marcadores com dois picos, em alguns deles, é possível perceber que há uma diferença grande de altura (desbalanço alélico), para humanos saudáveis se aceita uma diferença de até 30%, contudo as células imortalizadas ao longo das passagens podem apresentar essa diferença como resultado da degeneração genética, além disso, a presença de três ou quatro picos em um ou dois marcadores não é um evento raro.

Independente do *kit* utilizado o alelo será sempre o mesmo para um mesmo marcador em um mesmo indivíduo e por isso passíveis de comparação com os diferentes bancos de dados (Tabela 2). Além da possibilidade de buscar um determinado perfil pelo nome da linhagem e comparar manualmente, o *websoftware* CLIMA⁵¹

permite uma busca por perfil de STR utilizando os alelos. O CLIMA (http://bioinformatics.hsanmartino.it/clima2/index_test.php) faz uma busca dentre 5.450 perfis disponíveis em diferentes bases de dados e retorna como resultado as linhagens com pelo menos 60% de similaridade, organizadas com mais semelhante no topo da lista⁵¹.

Tabela 1. Comparação entre as principais técnicas utilizadas em autenticidade celular.

Técnica	Descrição	Aplicação	Ref
Análise cromossômica / cariotipagem	Envolve a preparação de um espalhamento de metáfase com bandas cromossômicas e coloração para identificar o número do cromossomo e marcadores.	Spp; Ind	(52)
Análise de isoenzimas	Método bioquímico de separação de isoenzimas por eletroforese; a mobilidade de isoenzimas pode variar entre indivíduos ou entre espécies. Kits disponíveis incluem o sistema de eletroforese em gel Authentikit.	Spp;Ind	(53,54)
“fingerprint” de DNA multilocus	Método molecular de detecção de comprimento dentro de minissatélites de DNA que contém um número variável de seqüências repetidas em tandem. A análise é feita por Southern blot usando sondas de DNA, fago de M13 ou seqüências de oligonucleotídeo.	Ind	(55,56)
Perfil de STR - Short Tandem Repeat	Método molecular de detecção de variação de comprimento dentro de regiões de microssatélite de DNA contendo um número variável de seqüências repetidas em <i>tandem</i> . A análise é por PCR/eletroforese capilar, a interpretação é dependente de um padrão de peso molecular e <i>software</i> específicos de cálculos.	Ind	(57,58)
SNP - Single Nucleotide Polymorphism	Método molecular de detecção de mutações em um único nucleotídeo. A análise é baseada na identificação de um base dentre duas opções conhecidas para cada locus. Enquanto que no STR o alelo é o número de repetições de um conjunto de nucleotídeos, aqui o alelo é um nucleotídeo (por exemplo, para a posição 55009062 do cromossomo 7 há um SNP cujos alelos são G e T, com frequência do T igual aproximadamente 25% como descrito em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=712829). A grande vantagem desse marcador bi alélico é a capacidade de se trabalhar com amostras muito degradadas, a desvantagem é a necessidade de um número muito superior de loci que o STR.		(59,60)
DNA Barcode	Envolve o sequenciamento de um fragmento da subunidade 1 do citocromo oxidase C, um gene mitocondrial, a análise é feita pelo alinhamento das diferentes seqüências à mesma posição, as diferenças são computadas numa análise multivariada de agrupamento. O número de seqüências em base de dados públicas já alcança milhões. O DNA Barcode (Código de barras de DNA) tem se mostrado uma técnica prática para distinguir um grande número de espécies, virtualmente qualquer espécie que possua mitocôndria.	Spp	(61,62)

Spp=espécies; Ind=indivíduo ou linhagem; ref= referências.

STR: Short Tandem Repeat; SNP: Single Nucleotide Polymorphis; PCR: reação em cadeia da polimerase.



Tabela 2. Principais bancos de células com bancos de perfis genéticos.

Bancos de Célula	País	URL
ATCC	EUA	http://www.atcc.org/
Cell Bank of Australia	Austrália	http://www.cellbankaustralia.com/
DSMZ	Alemanha	http://www.dsmz.de/
ECACC	Reino Unido	http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp
ICLC	Itália	http://www.iclc.it/
JCRB	Japão	http://cellbank.nibio.go.jp/
RIKEN	Japão	http://www.brc.riken.go.jp/lab/cell/english/guide.shtml

ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ECACC: The European Collection of Cell Cultures; ICLC: Interlab Cell Line Collection; JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank; RIKEN: Designated National Research and Development Institute.

Linhagens celulares imortalizadas podem sofrer com diferentes alterações genéticas ao longo de suas passagens, com reflexo em seu perfil de STR. O *International Cell Line Authentication Committee* (ICLAC - iclac.org), um comitê internacional para autenticidade celular, e a norma ANSI/ATCC SDOW ASN-0002⁴² sugerem que uma concordância na identidade entre o perfil de referência e o perfil questionado de até 80% ainda indica autenticidade, ou seja, que as células são provenientes de um mesmo doador. Este é o padrão adotado mundialmente que permite uma intercomparabilidade de resultados. Apesar de bem estabelecida existem poucos trabalhos de levantamento de contaminação.

Estima-se que de 18,0% a 36,0% de todas as culturas utilizadas no mundo possuam algum erro, seja de autenticidade, contaminação intra ou interespecífica^{63,64}. No Brasil os dados sugerem que 12,0% (11/91) das culturas estejam contaminadas ou mal identificadas⁶⁵, enquanto o *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) reportou 17,9% (45/252)⁶³. Ainda, o Banco Nacional de Células do Irã encontrou erro em 18,9% das culturas (10/53)⁶⁶, o *Bioresource Collection and Research Center of China* (BCRCC) em 16,3% (17/104)⁶⁷, e o *China Infrastructure of Cell Line Resource* (CICR) em 20,7% (100/482)⁶⁸.

É interessante notar que, embora haja uma iniciativa do ICLAC em divulgar as linhagens celulares erroneamente identificadas (incluindo 24 linhagens de células não humanas dentre as 488 linhagens relatadas por terem erros em sua identidade)⁶⁹, o guia de autenticação de células disponibilizado pelo próprio comitê atualmente contempla apenas células de origem humana⁶⁹. Portanto, há uma grande possibilidade de haver subnotificação desses dados, considerando que embora órgãos regulatórios exijam também a autenticação de linhagens celulares não humanas, não há consenso no melhor método a ser utilizado para tal, o que permite que sejam utilizados métodos bioquímicos, imunológicos ou citogenéticos (Tabela 1), nem sempre implementados na rotina dos laboratórios.

Nesse sentido, o uso do Barcode de DNA vem sendo preconizado como método de escolha para determinar a espécie de uma linhagem celular. Trata-se da análise de um gene mitocondrial conservado, com variação na sequência intraespécie, o que permite o desenvolvimento de um ensaio de especiação de vertebrados e invertebrados baseado em PCR^{61,70}. A análise do citocromo C oxidase I (COI), um fragmento de aproximadamente 700 pares de base (pb), é extensivamente utilizada para identificação em nível

de espécie, permitindo identificação de linhagens celulares, alimentos e outros produtos de origem animal, amostras forenses, entre outros. O método surgiu através de um consórcio formado principalmente por museus, que precisavam de um método mais confiável de identificação de espécies, além da extensiva análise morfológica⁷¹. Posteriormente, houve intenso interesse de órgãos regulatórios em virtude da crescente necessidade do mercado em fiscalizar adulterações e fraudes especialmente em alimentos. O Barcode de DNA é uma ferramenta riquíssima com grande potencial por ser relativamente simples e rápida, podendo substituir com sucesso técnicas mais trabalhosas e menos reprodutíveis como a tipagem bioquímica por isoenzimas ou a cariotipagem. Considerando que a publicação da norma ANSI/ATCC ASN-0002 em 2011 fez com que a análise de fragmentos para identidade de células humanas passasse a ser realizada por repositórios de célula por todo o mundo, é esperado que, com a publicação da norma ANSI/ATCC ASN-0003 de 2015 (<https://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ANSI%2fATCC+ASN-0003-2015>), o método de Barcode de DNA seja difundido e amplamente utilizado na identificação de linhagens celulares não humanas, ao menos reduzindo o problema do grande desconhecimento sobre as contaminações interespecíficas em linhagens celulares.

O uso de linhagens celulares contaminadas conduz a resultados, via de regra, errôneos e não reprodutíveis. As publicações com esses dados custam milhares de dólares, geram uma confusão que pode levar anos para ser elucidada e por consequência um atraso significativo no avanço da ciência. Por exemplo, Dirks et al.⁷² apresentaram dados apontando que a linhagem de célula endotelial ECV-304 havia se tornado um subclone da linhagem T24, células de carcinoma de bexiga, provavelmente por uma contaminação no laboratório de origem⁴⁴. Apesar disso, mais de 500 trabalhos foram publicados após a divulgação do problema⁷³, a validade dos resultados é questionável e certamente não comparável.

A questão torna-se ainda mais alarmante quando levantados os impactos financeiros. Nos Estados Unidos¹⁵, foi estimado que são gastos pelo menos 28 bilhões de dólares em pesquisas biomédicas não reprodutíveis. Linhagens celulares mal identificadas ou contaminadas são relacionadas como um dos fatores que contribuem para esse cenário. Apesar de uma análise de STR ser capaz de identificar uma identificação errônea ou contaminação e ser relativamente de baixo custo (aproximadamente 200 dólares por amostra) apenas um terço dos laboratórios testam suas linhagens



regularmente⁷⁴. A Figura 3 ilustra um perfil contaminado, em comparação a Figura 1 fica claro que a amostra celular continha mais de um tipo. Freedman et al.¹⁶ exemplificaram bem a questão: um pesquisador acadêmico financiado pelo *National Institute of Health* (NIH) recebe em média USD 450.000,00. Ele gastaria apenas 0,2% de todo recurso para validar a identidade as células compradas e seu próprio estoque. No total o NIH investe USD 3,7 bilhões em pesquisas que utilizam linhagens ou culturas de células, um quarto desses projetos utilizam linhagens celulares com algum tipo de problema que representa 750 milhões de dólares e acelerariam o progresso da pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças¹⁶.

Nardone³⁵ e Nelsson-Rees et al.³⁶ são considerados as duas maiores referências na busca pela erradicação do uso de células contaminadas ou não autênticas e propuseram, dentre outras coisas, que grandes periódicos científicos e até mesmo agências de fomento exigissem comprovação da autenticidade das culturas utilizadas nos projetos/artigos. Apesar de esta prática não ter sido completamente adotada, surtiu algum impacto positivo, sobretudo na cultura mundial de verificação de contaminantes em culturas. Já Capes-Davis et al.⁷⁵ optaram pela profilaxia e pesquisaram as principais fontes de erros: inventariamento incorreto, rotulagem, erros tipográficos, nomes semiapagados, manipulação simultânea de diferentes linhagens e utilização da mesma pipeta em diferentes culturas⁷⁵.

Mesmo com a técnica de STR sendo rotineira em muitos laboratórios de biologia molecular, celular e genética, no Brasil, apenas o Laboratório de Bioengenharia Tecidual (Labio_ do Inmetro) a oferece como um serviço normatizado para a comunidade científica, indústria e centros de pesquisa e tecnologia.

Apesar disso, menos de 10 instituições já solicitaram o serviço e destas, menos de cinco são solicitantes frequentes. A exceção de duas, todas as instituições estão no Sudeste. Na busca por uma mudança de cultura serão oferecidos cursos de autenticidade e pureza celular para os laboratórios da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama).

Apesar dos esforços de diferentes grupos em chamar a atenção para a questão da autenticidade das culturas celulares, que remontam há mais de três décadas, ainda hoje temos alguns números preocupantes⁶⁸, principalmente vindos de países que demoraram mais a incutir a cultura de verificar suas linhagens. Por outro lado, como algo positivo, temos que autenticidade e pureza celular deixaram de ser uma preocupação apenas do eixo Estados Unidos-Europa-Japão para se tornar um movimento mundial de governos, empresas e pesquisadores em prol de uma ciência mais reprodutível e de qualidade.

Panorama atual do controle de qualidade de células realizado por coleções biológicas

Em 2014, Geraghty et al.⁷⁶ sugeriram diretrizes para o uso de linhagens celulares em pesquisa biomédica. Dentre estas diretrizes, a primeira delas diz que é recomendável que as linhagens de um estudo sejam adquiridas de uma coleção biológica reconhecida. Nesse sentido, é consenso entre as diversas coleções internacionais a importância dos testes de identificação de perfil genético humano por STR e da avaliação de contaminação por micoplasmas. Dependendo da infraestrutura disponível ou do investimento em outras técnicas, análises de contaminação viral também são disponibilizadas. Muitos dos bancos, além de

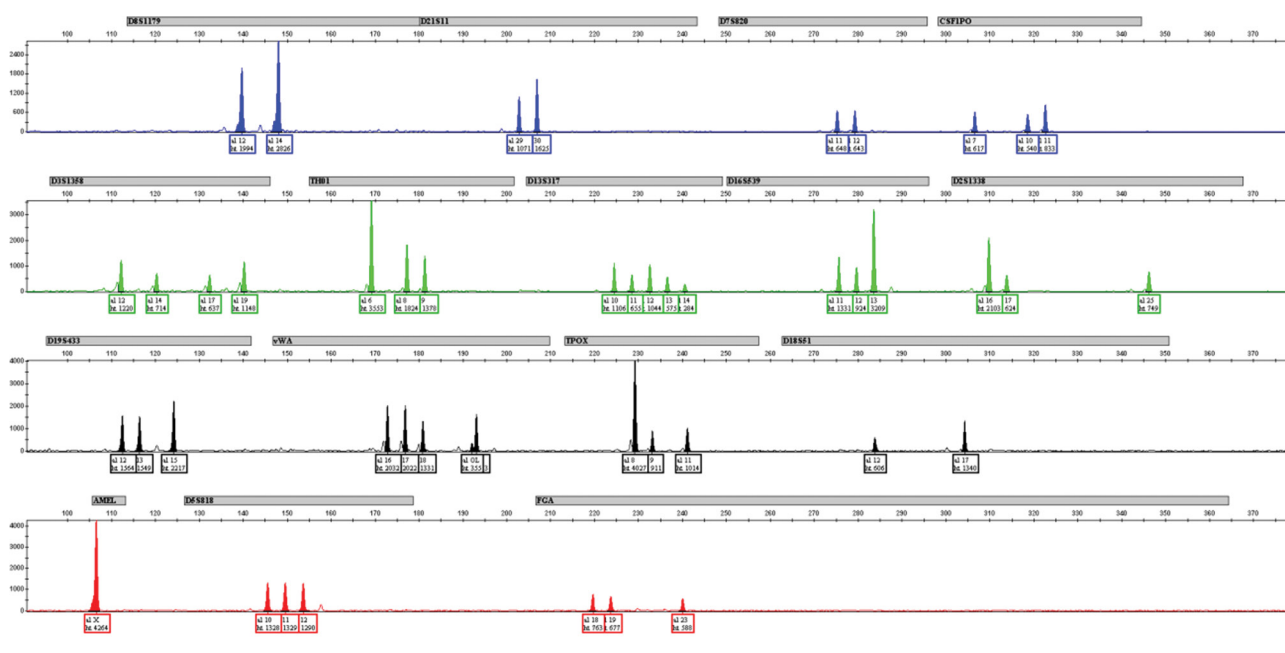


Figura 3. Perfil de STR mostrando uma contaminação. A identificação da mistura de DNA de dois ou mais indivíduos é indubitável, como já explanado cada marcador deveria apresentar no máximo dois picos (humanos são diploides), excepcionalmente aceita-se uma trissomia em um ou dois marcadores. Na imagem praticamente todos os marcadores apresentam tri- ou tetra- somia, ou seja, três a quatro picos indicando a contaminação cruzada entre dois ou mais indivíduos (linhagens celulares). O desbalanço alélico, ou seja, a diferença na altura entre dois picos dentro do mesmo marcador indica que aquele alelo está recebendo uma contribuição maior que o(s) outro(s) alelo(s).



Tabela 3. Tabela demonstrativa do controle de qualidade de linhagens distribuídas e de demais serviços oferecidos por coleções biológicas internacionais.

Coleção Biológica	Controles de qualidade das linhagens celulares de seu acervo	Serviços oferecidos
ATCC (EUA)	<ul style="list-style-type: none">• Perfil de STR (linhagens humanas)• Testes de esterilidade para bactérias, fungos e micoplasmas• Testes de detecção viral para HBV, citomegalovírus, HIV, EBV, HPV	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação de micoplasmas por fluorescência• Distribuição de linhagens celulares
Cell Bank of Australia	<p>O banco comercializa linhagens do ECACC, submetidas ao controle da origem. Porém, em linhagens exclusivas de seu acervo, realiza os controles de:</p> <ul style="list-style-type: none">• Perfil de STR (linhagens humanas)• Barcode para identificação da espécie• Testes de esterilidade para micoplasmas	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Identificação de espécies para linhagens não humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por Bioluminescência• Distribuição de linhagens celulares
DSMZ (Alemanha)	<ul style="list-style-type: none">• Testes de esterilidade para micoplasmas• Imunomarcagem de proteínas de membrana e citoesqueleto• DNA fingerprinting• Barcode para identificação da espécie• Cariotipagem• Análise de contaminação viral por HBV, HCV, EBV, HHV-8, HHV-4, HIV-1, HIV-2, HTLV 1 e 2, HPV, SMRV, XMRV	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise online de perfil de STR obtido pelos clientes• Identificação de espécies para linhagens não-humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Serviço de descontaminação de linhagens com micoplasmas• Serviço de detecção viral: HBV, HCV, EBV, HHV-8, HHV-4, HIV-1, HIV-2, HTLV 1 e 2, HPV, SMRV, XMRV• Distribuição de linhagens celulares
ECACC (Reino Unido)	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise online de perfil de STR obtido pelos clientes• Identificação de espécies para linhagens não humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação microbiológica e identificação de bactérias e fungos	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise online de perfil de STR obtido pelos clientes• Identificação de espécies para linhagens não-humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação de micoplasmas por fluorescência• Análise de contaminação microbiológica e identificação de bactérias e fungos
ICLC (Itália)	<ul style="list-style-type: none">• Identificação de espécies por isoenzimas• Identificação de espécies por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos• Identificação de linhagens humanas por STR• Testes de esterilidade por micoplasmas	<ul style="list-style-type: none">• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por ensaios bioquímico• Análise de contaminação de micoplasmas por fluorescência• Distribuição de linhagens celulares
RIKEN (Japão)	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Identificação da espécie por Isoenzimas e PCR• Identificação da linhagem de camundongo por SSLP• Identificação dos contaminantes virais HBV (oriundas de fígado), HCV (fígado), HIV (sangue), HTLV-1 (sangue) e EBV (sangue e tumores)• Teste de esterilidade de micoplasmas por PCR e isoenzimas	<ul style="list-style-type: none">• Distribuição de linhagens celulares
BCRJ (Brasil)	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Teste de esterilidade de micoplasmas por Bioluminescência, PCR e/ou fluorescência• Teste microbiológico para esterilidade de bactérias e fungos	<ul style="list-style-type: none">• Testes de avaliação de contaminação de micoplasmas por Bioluminescência ou PCR• Distribuição de linhagens celulares

STR: Short Tandem Repeat; SNP: Single Nucleotide Polymorphis; PCR: reação em cadeia da polimerase; ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ECACC: The European Collection of Cell Cultures; ICLC: Interlab Cell Line Collection; RIKEN: Designated National Research and Development Institute; BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro.

oferecer a distribuição das linhagens testadas também oferecem os serviços de controle de qualidade em seus portfólios de serviço, como descrito na Tabela 3. Deste modo, é possível observar que a oferta de culturas celulares com qualidade agregada aumentou consideravelmente e a sua aquisição junto a coleções biológicas que as oferecem após os devidos testes de autenticidade e pureza mostra-se como o padrão ouro para a implementação de ensaios *in vitro* que as utilizam, com finalidade de indústria ou pesquisa.

CONCLUSÕES

Considerando todo o investimento aplicado em pesquisa científica em âmbito mundial, o desenvolvimento de novas metodologias alternativas ao uso de animais e o consenso crítico de que o conceito de qualidade também deve ser aplicado nas ferramentas que utilizam cultivos celulares em seus modelos testes, conclui-se que qualquer laboratório deve garantir o controle de pureza e autenticidade de suas linhagens.



Com a aceitação formal da Anvisa dos protocolos reconhecidos pelo Concea, diversos laboratórios poderão prestar serviços na área de análise toxicológica *in vitro*. Neste sentido, as Diretrizes da OECD são muito claras no que diz respeito ao controle de qualidade das linhagens utilizadas, tais como o registro do controle periódico de contaminação por micoplasmas, por exemplo. Caso a linhagem seja humana, recomenda-se a identificação do perfil genético por STR. Para as linhagens não humanas, o *barcode* surge como possível técnica de identificação, ao menos, da espécie da linhagem, que poderá sempre ser acompanhada pela avaliação morfológica e dados originais da literatura sobre seu o isolamento.

Além disto, nas pesquisas que envolvem células tumorais, cuja grande maioria é de origem humana, diversos periódicos internacionais já exigem testes de identidade celular para a publicação de artigos. Sendo assim, o Inmetro, como Laboratório Central da Renama, tem se empenhado na implantação e desenvolvimento de metodologias de pureza e autenticidade celulares, de modo a possibilitar o treinamento e/ou oferecimento deste tipo de serviço para os laboratórios de ensaio e centros de pesquisa do país, com o objetivo de agregar confiabilidade e reprodutibilidade dos dados gerados no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Begley CG, Ellis LM. Drug development: raise standards for preclinical cancer research. *Nature*. 2012;483(7391):531-3. <https://doi.org/10.1038/483531a>
2. Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Ferreira N, Balthazar N, Monteiro AM, Borojevic R et al. Performance of PCR-based and Bioluminescent assays for mycoplasma detection. *J Microbiol Methods*. 2015;118:31-6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.010>
3. Lees JS, Sena ES, Egan KJ, Antonic A, Koblar SA, Howells DW et al. Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke*. 2012;7(7):582-8. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00797.x>
4. Piuze NS, Chahla J, Schrock JB, LaPrade RF, Pascual-Garrido C, Mont MA et al. Evidence for the use of cell-based therapy for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review of the literature. *J Arthroplasty*. 2017;32(5):1698-708. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2016.12.049>
5. Kim G, Eom YW, Baik SK, Shin Y, Lim YL, Kim MY et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells for patients with chronic liver diseases: systematic review and meta-analysis. *J Korean Med Sci*. 2015;30(10):1405-15. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.10.1405>
6. Stryeck S, Birner-Gruenberger R, Madl T. Integrative metabolomics as emerging tool to study autophagy regulation. *Microb cell*. 2017;4(8):240-58. <https://doi.org/10.15698/mic2017.08.584>
7. Negoro T, Okura H, Matsuyama A. Induced Pluripotent stem cells: global research trends. *Biores Open Access*. 2017;6(1):63-73. <https://doi.org/10.1089/biores.2017.0013>
8. Amelian A, Wasilewska K, Megias D, Winnicka K. Application of standard cell cultures and 3D *in vitro* tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacol Rep*. 2017;69(5):861-70. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>
9. Caballero D, Kaushik S, Correlo VM, Oliveira JM, Reis RL, Kundu SC. Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: from chip to the patient. *Biomaterials*. 2017;149:98-115. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.005>
10. Sewell F, Doe J, Gellatly N, Ragan I, Burden N. Steps towards the international regulatory acceptance of non-animal methodology in safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017;89:50-6. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.001>
11. Hamm J, Sullivan K, Clippinger AJ, Strickland J, Bell S, Bhatarai B et al. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: moving from research to regulatory testing. *Toxicol In Vitro*. 2017;41:245-59. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.004>
12. Vinken M, Knapen D, Vergauwen L, Hengstler JG, Angrish M, Whelan M. Adverse outcome pathways: a concise introduction for toxicologists. *Arch Toxicol*. 2017;91(11):3697-707. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2020-z>
13. Evans SJ, Clift MJ, Singh N, de Oliveira Mallia J, Burgum M, Wills JW et al. Critical review of the current and future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis*. 2017;32(1):233-41. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew054>
14. Leite PE, Pereira MR, Granjeiro JM. Hazard effects of nanoparticles in central nervous system: searching for biocompatible nanomaterials for drug delivery. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(7):1653-60. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.023>
15. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016;533(7604):452-4. <https://doi.org/10.1038/533452a>
16. Freedman LP, Gibson MC, Ethier SP, Soule HR, Neve RM, Reid YA. Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication. *Nat Methods*. 2015;12(6):493-7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3403>
17. Casadevall A, Steen RG, Fang FC. Sources of error in the retracted scientific literature. *FASEB J*. 2014;28(9):3847-55. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256735>
18. Sobral FR, Campos CJ. Utilização de metodologia ativa no ensino e assistência de enfermagem na produção nacional: revisão integrativa. *Rev Esc Enferm USP*. 2012 Feb;46(1):208-18. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342012000100028>
19. Oliveira TFP, Fonseca Junior AA, Camargos MF, Oliveira AM, Cottorello ACP, Souza AR et al. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*. 2013 Nov;41(6):407-14. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.08.005>



20. Souza FTS. Efeito do micoplasma e do agente removedor de micoplasma (MRA) sobre a medida da atividade de hidrolases lisossômicas, em culturas de fibroblastos humanos [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
21. Pinheiro de Oliveira TF, Fonseca Júnior AA, Camargos MF, de Oliveira AM, Lima NF, Freitas ME et al. Porcine parvovirus as a contaminant in cell cultures and laboratory supplies. *Biologicals*. 2016;44(2):53-9. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.12.003>
22. Timenetsky J, Miyaki C, Mendes IF, Rizzo E. Identificação de micoplasmas pela inibição de crescimento de amostras isoladas de culturas celulares. *Rev Saude Publica*. 1992;26(1):17-20. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101992000100004>
23. Volokhov DV, Norris T, Rios C, Davidson MK, Messick JB, Gulland FM et al. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Microbiol*. 2011;149(1-2):262-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.026>
24. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res*. 1977;104(2):255-62. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90089-1)
25. Molla Kazemiha V, Amanzadeh A, Memarnejadian A, Azari S, Shokrgozar MA, Mahdian R et al. Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. *Cytotechnology*. 2014;66(5):861-73. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9640-9>
26. Sadeghi M, Kapusinszky B, Yugo DM, Phan TG, Deng X, Kanevsky I et al. Virome of US bovine calf serum. *Biologicals*. 2017;46:64-7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.0028>.
27. Toohey-Kurth K, Sibley SD, Goldberg TL, Phan TG, Deng X, Kanevsky I et al. Metagenomic assessment of adventitious viruses in commercial bovine sera. *Biologicals*. 2017;47:64-8. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.10.009>
28. Flatschart RB, Almeida DO, Santos NC, Boldrini LC, Granjeiro JM, Folgueras-Flatschart LAC. The impact of BVDV presence on fetal bovine serum used in the biotechnology industry. In: Berhardt LV, editor. *Advances in medicine and biology*. [S. l.]: Nova Sciences; 2016. p. 75-94.
29. Gey GO, Coffmann WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*. 1952;12:264-5.
30. Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1958;21(6):1131-47. <https://doi.org/10.1093/jnci/21.6.1131>
31. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51(5):1409-16. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
32. Rothfels KH, Axelrad AA, Siminovitch L, McCulloch EA, Parker RC. The origin of altered cell lines from mouse, monkey, and man. as indicated by chromosome and transplantation studies. In: Begg RW, editor. *Proceedings of the Third Canadian Cancer Research Conference*. New York: Academic Press; 1958. p. 189-214.
33. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *Vitr Cell Dev Biol Anim*. 2010 Oct 8;46(9):727-32. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9333-z>
34. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1463-7. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.9.1463>
35. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23(6):367-72. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9019-9>
36. Nelson-Rees WA, Flandermeyer RR, Hawthorne PK. Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. *Science*. 1974;184(4141):1093-6. <https://doi.org/10.1126/science.184.4141.1093>
37. OECD. Test No. 473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. 2014[acesso 5 nov 2017]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_9789264224223-en
38. World Health Organization - WHO. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Geneva: World Health Organization; 2010.
39. Food and Drug Administration. Guidance for industry: characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications. 2010[acesso 5 nov 2017]. Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2010/03/04/2010-4553/guidance-for-industry-characterization-and-qualification-of-cell-substrates-and-other-biological>
40. Padilla-Nash HM, Barenboim-Stapleton L, Difilippantonio MJ, Ried T. Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):3129-42. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.358>
41. Gartler SM. Genetic markers as tracers in cell culture. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1967;26:167-95.
42. American National Standards Institute. ANSI/ATCC ASN-0002-2011. Authentication of human cell lines: standardization of STR profiling. [S.l.]: American National Standards Institute; 2011.
43. Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Mouse cell line authentication. *Cytotechnology*. 2014;66(1):133-47. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9545-7>



44. Hall E. RGC-5 is not rat retinal ganglion. [S. l.]: International Cell Line Authentication Committee; 2015[acesso 8 nov 2017]. Disponível em: <http://iclac.org/case-studies/rgc-5/>
45. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003;4(4):119-41. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110352>
46. Butler JM. Overview and history of DNA typing. In: Butler JM, editor. *The evaluation of forensic DNA evidence.* San Diego: Academic Press; 2010. p. 1-18.
47. Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers forensic DNA typing. San Diego: Academic Press; 2005.
48. Francez PAC, Silva EFA. Biologia forense. In: Velho JA, Geiser GC, Espindula A, editores. *Ciências forenses: uma introdução às principais áreas da criminalística moderna.* Campinas: Millennium; 2012. p. 191-211.
49. Butler JM. Chapter 11 - Statistical interpretation: evaluating the strength of forensic DNA evidence. In: Butler JM, editor. *The evaluation of forensic DNA evidence.* San Diego: Academic Press; 2010. p. 229-58.
50. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci.* 2001;46(3):647-60. <https://doi.org/10.1520/JFS15018J>
51. Romano P, Manniello A, Aresu O, Armento M, Cesaro M, Parodi B. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D925-32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn730>
52. MacLeod RA, Kaufmann M, Drexler HG. Cytogenetic harvesting of commonly used tumor cell lines. *Nat Protoc.* 2007;2(2):372-82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.29>
53. O'Brien SJ, Shannon JE, Gail MH. A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: isozyme and allozyme genetic signatures. *In Vitro.* 1980;16(2):119-35. <https://doi.org/10.1007/BF02831503>
54. Stacey GN, Hoelzl H, Stephenson JR, Doyle A. Authentication of animal cell cultures by direct visualization of repetitive DNA, aldolase gene PCR and isoenzyme analysis. *Biologicals.* 1997;25(1):75-85. <https://doi.org/10.1006/biol.1996.0062>
55. Stacey GN, Bolton BJ, Morgan D, Clark SA, Doyle A. Multilocus DNA fingerprint analysis of cell banks: stability studies and culture identification in human B-lymphoblastoid and mammalian cell lines. *Cytotechnology.* 1992;8(1):13-20. <https://doi.org/10.1007/BF02540025>
56. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature.* 1985;316(6023):76-9. <https://doi.org/10.1038/316076a0>
57. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(14):8012-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.121616198>
58. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 2006;51(2):253-65. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x>
59. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998;280(5366):1077-82. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1077>
60. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA et al.; International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449(7164):851-61. <https://doi.org/10.1038/nature06258>
61. Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings Biol Sci.* 2003;270 Suppl(Suppl_1):S96-9. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
62. Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanner R et al. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43(10):344-51. <https://doi.org/10.1007/s11626-007-9060-2>
63. MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer.* 1999;83(4):555-63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991112\)83:4<555::AID-IJC19>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19991112)83:4<555::AID-IJC19>3.0.CO;2-2)
64. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):315-9. <https://doi.org/10.1038/nrc775>
65. Cosme B, Falagan-Lotsch P, Ribeiro M, Napoleão K, Granjeiro JM, Moura-Neto R. Are your results valid? Cellular authentication a need from the past, an emergency on the present. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017;53(5):430-4. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0124-z>
66. Azari S, Ahmadi N, Tehrani MJ, Shokri F. Profiling and authentication of human cell lines using short tandem repeat (STR) loci: Report from the National Cell Bank of Iran. *Biologicals.* 2007;35(3):195-202. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2006.10.001>
67. Wu ML, Liao LC, Chen CY, Lee SY, Yuan GF, Hwang SM. A 2-yr service report of cell line authentication. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013;49(10):743-5. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9669-2>
68. Bian X, Yang Z, Feng H, Sun H, Liu Y. A Combination of species identification and STR profiling identifies cross-contaminated cells from 482 human tumor cell lines. *Sci Rep.* 2017 Aug;7(1):9774. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09660-w>
69. International Cell Line Authentication Committee - ICLAC. *ICLAC. org Naming a Cell Line.* Vol. 8. 2014.



70. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3(5):294-9.
71. Ratnasingham S, Hebert PD. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes.* 2007;7(3):355-64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
72. Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross- contamination at source. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35(10):558-9. <https://doi.org/10.1007/s11626-999-0091-8>
73. Dittmar KE, Simann M, Zghoul N, Schön O, Meyring W, Hannig H et al. Quality of cell products: authenticity, identity, genomic stability and status of differentiation. *transfus med hemother.* 2010;37(2):57-64. <https://doi.org/10.1159/000284401>
74. Buehring GC, Eby EA, Eby MJ. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 40(7):211-5. [https://doi.org/10.1290/1543-706X\(2004\)40<211:CLCHAA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1543-706X(2004)40<211:CLCHAA>2.0.CO;2)
75. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 2010;127(1):1-8. <https://doi.org/10.1002/ijc.25242>
76. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I et al.; Cancer Research UK. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer.* 2014;111(6):1021-46. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>

Agradecimentos

Agradecemos os recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama) - vinculados ao Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTI) - que possibilitam a continuidade das ações no âmbito de controle de qualidade de linhagens celulares no Laboratório de Bioengenharia Tecidual do Inmetro. Ao Dr. Alberto Fraile-Ramos (que foi bolsista do programa Pronametro, do Inmetro), atualmente professor na *Universidad Complutense de Madrid*, pelas fotografias cedidas.

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.

Revisão integrativa para substituição do soro fetal bovino por plasma humano rico em plaquetas para cultivo e expansão ex vivo de células humanas destinadas às terapias avançadas

Integrative review for replacement of fetal bovine serum by platelet-rich human plasma for culture and ex vivo expansion of human cells for advanced therapies

Karla Menezes

Esther Rieko Takamori

Marcus Vinicius Telles Teixeira

Rosana Bizon Vieira Carias

Radovan Borjevic

RESUMO

Introdução: O avanço dos ensaios clínicos e da terapia celular implicam na necessidade de substituição do soro fetal bovino por um produto de origem humana, capaz de sustentar a expansão de células humanas destinadas às pesquisas e terapias celulares. **Objetivo:** Esta revisão integrativa teve como objetivo principal avaliar diferentes alternativas de suplementação de cultura celulares livres de produtos animais, chamadas de culturas celulares *xeno-free*. **Método:** Foi realizada a análise de 50 artigos recuperados do PubMed publicados até janeiro de 2018 em língua inglesa ou em português. **Resultados:** O plasma rico em plaquetas (PRP) é considerado como uma boa alternativa para suplementação do meio de cultura celular. O PRP é obtido a partir do sangue, e possui um rico conteúdo liberado pelas plaquetas ativadas, capaz de estimular a proliferação e a diferenciação de diversos tipos de células, tanto diferenciadas quanto progenitoras. A utilização do PRP em sistemas de cultura celular *xeno-free* não oferece risco de alterações genéticas da população celular, tampouco sua contaminação com patógenos. As vantagens de sua utilização incluem: 1) a possibilidade de uso de soro autólogo; 2) redução de riscos de contaminação; 3) facilidade de preparo e 4) baixo custo de produção. **Conclusões:** O uso de concentrado de plaquetas descartados nos centros de hemoterapia é uma boa alternativa para a produção do PRP, que será utilizado sistematicamente na cultura de células humanas. O desafio é padronizar esse processo de produção, de forma a garantir a qualidade do produto destinado às terapias avançadas.

PALAVRAS-CHAVES: Plasma Rico em Plaquetas; Cultura Celular; Terapia Celular; Ensaios Clínicos

ABSTRACT

Introduction: The advancement of clinical trials and cell therapy require the replacement of fetal bovine serum by a product of human origin, capable of sustaining an expansion of human cells for research and cell therapy. **Objective:** This integrative review had as main objective to evaluate different alternatives of cell culture supplementation free of animal products, called *xeno-free* cell cultures. **Method:** Fifty selected articles from PubMed published up to January 2018 in English or Portuguese were evaluated. **Results:** Platelet rich plasma (PRP) is considered to be a good alternative for supplementation of the cell culture media. PRP is obtained from blood, and has a rich content released by activated platelets, capable of stimulating proliferation and differentiation of several cell types, both fully differentiated and the progenitor ones. Use of PRP in “*xeno-free*” cell culture systems has apparently no risk of genetic alterations of the cells, nor their contamination with pathogens. Advantages of its use include: 1) the possibility of using autologous serum; 2) reducing the risk of contamination; 3) easy preparation and 4) low cost of production. **Conclusions:** The use of discarded platelet concentrate in hemotherapy centers is a good alternative for the production of PRP, which will be used systematically in the culture of human cells. The challenge is to standardize this production process, in order to grant the quality of the product to be used in advanced therapies.

Faculdade de Medicina de Petrópolis
/FASE, Petrópolis, RJ, Brasil

* E-mail: karlamenezess@gmail.com

Recebido: 13 out 2017

Aprovado: 31 jan 2018

KEYWORDS: Platelet-rich Plasma; Cell Culture; Cell Therapy; Clinical Trials



INTRODUÇÃO

O soro fetal bovino (SFB) é o suplemento mais utilizado para a expansão *ex vivo* de células humanas destinadas a ensaios clínicos e terapias celulares. No entanto, as diretrizes de boas práticas de fabricação de insumos para uso clínico (*Good Manufacturing Practice - GMP*) recomendam substituir os produtos derivados de animais por produtos quimicamente definidos, ou por produtos derivados de humanos.

O SFB não é um produto definido e, sendo de origem bovina, as reações imunológicas contra antígenos xenogênicos no organismo receptor não podem ser excluídas. As proteínas do SFB associam-se ao complexo principal (maior) de histocompatibilidade (CPH) de classe I em culturas celulares de longo prazo, levando à proliferação de células T no recipiente, mesmo numa configuração de uso de células autólogas cultivadas¹. Os glicoconjugados do soro bovino podem ser diretamente transferidos do meio de cultivo às células e incorporados nas membranas de células cultivadas, permanecendo na sua composição por até 48 horas, podendo causar uma reação imunológica aguda. Patógenos e seus derivados como micoplasmas, endotoxina bacterianas, vírus e príons não são necessariamente eliminados do meio de cultivo de células contendo soro bovino, e podem ser potencialmente transferidos para os pacientes que irão receber o transplante celular^{2,3,4,5}. Além disso, existem preocupações sobre o desajuste entre as demandas globais e os suprimentos do SFB, de um ponto de vista ético e de bem-estar animal, uma vez que o SFB é coletado de fetos bovinos^{6,7}. É importante considerar também o problema da variabilidade lote a lote do SFB, com diferenças qualitativas e quantitativas decorrentes de influências geográficas e sazonais. O conjunto destes fatores leva os órgãos regulatórios a recomendarem o desenvolvimento de protocolos de cultura celulares livres de produtos animais, chamadas de culturas celulares *xeno-free*^{6,7}.

O desafio é encontrar um substituto biológico de origem humana, que não ofereça riscos à saúde e que seja capaz de sustentar a proliferação celular. As quantidades de células usadas em ensaios clínicos ou terapias celulares são altas, podendo atingir ou ultrapassar a ordem de 100.000.000 de células por paciente, o que requer uma alta e prolongada estimulação da proliferação celular *in vitro*⁸. Também, é importante manter o perfil celular desejado ao longo do processo de expansão *in vitro*, que pode variar de um estágio mais imaturo até alcançar um estágio completo de diferenciação celular, dependendo da qualidade de meio de cultivo e de seus suplementos⁹.

Diferentes populações de células humanas são avaliadas em ensaios clínicos. Células adultas, em estágios avançados de diferenciação celular, podem ser isoladas de tecidos humanos e ser aplicadas no tratamento de doenças específicas. Elas possuem uma capacidade de proliferação celular limitada, por isso, sua aplicação clínica é restrita. Células progenitoras e/ou células-tronco adultas, por outro lado, apresentam um

alto potencial de proliferação celular e podem dar origem a diferentes linhagens celulares, sendo alvo de inúmeros estudos. O tipo de célula-tronco mais avaliado em ensaios clínicos no mundo é a célula mesenquimal estromal (*mesenchymal stem cell - MSC*)⁹. Neste momento, existem 760 estudos clínicos que avaliam a segurança e eficácia do tratamento com MSC em diferentes patologias*. As principais características das MSC incluem: aderência a superfícies de plástico, morfologia fibroblastoide, expressão de marcadores de superfície (CD105, CD73 e CD90), capacidade de formar colônias a partir de uma única célula (colônias formadoras de células fibroblastoides, CFU-F) e de se diferenciar em células de origem mesodérmica e ecto-mesodérmica^{10,11}. MSC são facilmente expandidas *in vitro* e são consideradas imunologicamente inertes, o que reduz o risco de rejeição do transplante celular¹². A maioria dos estudos abordam MSC isoladas a partir de cordão umbilical humano, sangue periférico, medula óssea ou tecido adiposo, mas as MSC podem ser isoladas, *a priori*, a partir de qualquer tecido adulto humano¹³.

Este estudo de revisão teve como objetivo avaliar diferentes alternativas de suplementação de cultura celulares *xeno-free*. Em particular, investigamos o potencial de utilização do plasma rico em plaquetas humano como substituto do SFB em cultura de células humanas.

MÉTODO

Este estudo foi elaborado como uma revisão integrativa. Foram avaliados 50 de 75 artigos científicos que abordavam métodos de suplemento de cultura *xeno-free*, comparando técnicas e resultados encontrados. A pesquisa de literatura científica foi realizada em documentos do Ministério da Saúde e por consulta à base de dados do PubMed para artigos publicados em inglês ou português até janeiro de 2018. Palavras-chave utilizadas: *cell culture, xeno-free, platelet-rich plasma, plasma, platelet lysate, chemically-defined xeno-free medium, cell therapy, clinical trials, mesenchymal stem cells, progenitor cells, human cells, human serum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alternativas para sistemas de cultura *xeno-free*

Existem diferentes suplementos de cultura celular *xeno-free* comercialmente disponíveis no mercado. A princípio, esses produtos industrializados são padronizados e não interferem no perfil celular¹⁴. No entanto, alguns estudos alertam sobre alterações biológicas importantes de algumas células humanas quando cultivadas com meios de cultura *xeno-free* comerciais. MSC de tecido adiposo humano, cultivadas em sistema de cultura *xeno-free* com produtos industrializados, apresentaram uma redução significativa da aderência celular e perda do

* Fonte: clinicaltrials.gov. Acesso em 20 set 2017.



marcador de superfície celular CD54 (ICAM-1). Também foram detectadas variações na expressão de CD11a, CD14, CD10 e CD86, os quais estão relacionados com a interação das MSC com células do sistema imunológico, o que pode ter afetado a sua imunogenicidade¹⁵. Além disso, as MSC não conseguem formar esferoides quando cultivadas em três dimensões com alguns tipos de meios de cultura *xeno-free*¹⁶. Existe uma mudança no perfil genético destas células humanas, com redução da produção de citocinas anti-inflamatórias e moléculas antitumorais¹⁶. Acredita-se que o potencial terapêutico das MSC possa ser comprometido com a utilização de determinados produtos *xeno-free* comerciais^{15,16}. Existe um pensamento equivocado de que estes produtos industrializados são quimicamente definidos e totalmente desprovidos de produtos animais. Na verdade, eles possuem fatores de crescimento em quantidades indefinidas e podem ser suplementados com albumina de soro humano ou animal¹⁵.

Outra opção de suplementação de cultura celular *xeno-free* é a adição de fatores de crescimento ao meio de cultura. Eles podem ser sintéticos ou derivados de tecido animal ou humano, sendo utilizados de forma isolada ou combinados como um coquetel¹⁵. O uso de fatores de crescimento tem sido associado ao aumento da proliferação celular^{16,17} e pode induzir um fenótipo celular específico¹⁶. No entanto, sua aplicabilidade é reduzida porque eles não são capazes de sustentar a expansão celular a longo prazo¹⁵.

Derivados plaquetários humanos aplicados em sistemas de cultura celular *xeno-free*

Produtos derivados do plasma sanguíneo humano são considerados hoje como os potenciais substitutos do SFB para sistemas de cultura celular *xeno-free*^{18,19}. O plasma sanguíneo puro, coletado de um doador em estado fisiológico normal, contém normalmente baixas quantidades de fatores de crescimento celular. Entretanto, ele abriga as plaquetas que, apesar de apresentarem uma cito-arquitetura relativamente simples, possuem um conteúdo complexo e muito bem organizado. Esse conteúdo é liberado somente com a ativação das plaquetas. Isto pode ocorrer sob efeito de sinalização de fatores circulantes pró-inflamatórios, indicando a presença de uma agressão ou irritação tecidual. Alternativamente, uma lesão das paredes vasculares pode causar um sangramento grave e necessitar ser imediatamente resolvida. Ela expõe as plaquetas ao contato com a matriz extracelular tecidual, principalmente colágeno e os glicoproteínas associados, que imediatamente ativam as plaquetas, causando a liberação do seu conteúdo. A primeira consequência é a ativação *in situ* das cascatas de coagulação do sangue, que interrompe o sangramento com a liberação dos seus grânulos os fatores bioativos como serotonina, histamina, dopamina, cálcio e adenosina.

Tanto a inflamação quanto a ativação das plaquetas pela adesão nos tecidos lesados sinalizam também a necessidade de iniciar os processos de reparo tecidual. Essa é a segunda função das plaquetas ativadas, sendo elas os primeiros

componentes sanguíneos que chegam no local da lesão e liberam seus conteúdos granulares para promover o reparo tecidual²⁰. Nessa função, as plaquetas funcionam como grandes reservatórios de enzimas, hormônios e fatores de crescimento. Diversos fatores de crescimento celular já foram identificados, dentre eles: fator de crescimento tumoral (*transforming growth factor-b* - TGF-b), fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF), fator de crescimento tipo insulina I e II (*insulin-like growth factor* I, II - IGF-I, IGF-II), fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* - FGF), fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor* - EGF), fator de crescimento vaso-endotelial (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) e fator de crescimento de células endoteliais (*endothelial cells growth factor*). Estes fatores de crescimento e moléculas bioativas, produzidas pelas plaquetas, modulam e estimulam as células locais a promoverem regeneração. Esta sua capacidade moduladora é a principal justificativa de utilizar o conteúdo plaquetário em um ambiente de cultivo celular²¹.

Os produtos derivados de plaquetas que estão sendo avaliados em sistemas de cultura celular *xeno-free* são: 1) Plasma Puro (PP); 2) Plasma Rico em Plaquetas (PRP); 3) Lisado Plaquetário (LP). O PP e o PRP são obtidos através de uma sequência de centrifugações do sangue periférico. O PP é obtido através de apenas uma centrifugação, enquanto o PRP é obtido após duas ou mais centrifugações consecutivas. O LP, também conhecido como Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP), é obtido através de centrifugações seguidas pela adição de agonista de epinefrina, e posteriormente, ciclos repetidos de criocongelamento e descongelamento e choque hipotônico para interromper a membrana plasmática das plaquetas e liberar todos os seus conteúdos^{18,19}.

Em comum, todos eles possuem os mesmos componentes biológicos, isto é, possuem o rico conteúdo plaquetário. Porém, existe uma grande divergência nas nomenclaturas e nos métodos de preparo destes produtos biológicos. Não há um padrão no número de centrifugações, velocidade e temperatura ideal para isolar cada um destes produtos, nem mesmo existe um consenso sobre protocolo específico para cultura de cada tipo de célula⁵⁶. As variações englobam também aspectos como seleção de doadores, processo de coleta (aférese ou doação de sangue total), presença de solução aditiva, implementação de inativação de patógenos, tipo de ativação plaquetária, presença ou não de leucorredução e consideração sobre grupos sanguíneos ABO. Todos estes fatores podem influenciar a sua aplicabilidade¹⁹. O uso de PP, PRP ou LP como suplementos de cultura de células humanas possui efeitos distintos no comportamento celular e pode influenciar de forma diferente a migração, proliferação e diferenciação de células humanas (Tabela). A variabilidade do processo de produção é um problema para padronização destes produtos biológicos, e deve ser prioridade no processo de desenvolvimento de uma alternativa de culturas celulares *xeno-free*¹⁹.



Tabela. Comparação entre diferentes produtos derivados do sangue periférico humano, utilizados como suplemento de cultura celular *xeno-free*.

Produtos	siglas	Método de obtenção	Vantagens	Desvantagens	Resultados em cultura de células				Produção de proteínas da matriz extracelular	Inflamação
					Proliferação celular	Fenótipo celular	Diferenciação celular	Migração celular		
1) Plasma Puro	PP	Única centrifugação do sangue, em baixa rotação e velocidade ⁹ .	* O preparo do PP é fácil, rápido e com menor custo, em relação ao PRP e LP ²² .	* Baixa concentração de plaquetas e fatores de crescimento em relação ao PRP e LP ²² .	* PP exibe um efeito semelhante ao SFB na proliferação de MSC de tecido adiposo humano expandidas <i>in vitro</i> ^{5,14} .	* PP utilizado como suplemento de cultura de MSC de tecido adiposo humano não altera seu fenótipo ^{5,14} .	* PP não altera seu potencial de diferenciação celular de MSC humanas ^{5,14} , mas a diferenciação osteogênica pode ser menos favorável na suplementação com PP do que com SFB ²³ .	-	-	-
2.1) Plasma Rico em plaquetas	PRP	Duas ou mais centrifugações consecutivas do sangue periférico.	* O PRP apresenta maior concentração de plaquetas e fatores de crescimento do que o PP ²² . * A suplementação com PRP humano de cultura de MSC humanas não provoca a formação de tumores ²⁶ .	* É necessário um grande volume de sangue para preparo do PRP ¹⁴ . * Existe uma variabilidade biológica entre amostras de PRP ¹⁴ .	* A proliferação celular de MSC humanas suplementadas com PRP é 13,9 vezes maior do que quando elas são cultivadas com SFB ⁷ . * PRP utilizado como suplemento de cultura <i>xeno-free</i> aumenta a proliferação de mioblastos ²⁸ , tenócitos ²⁹ , condrócitos ^{10,30,31} , MSC da medula óssea ¹⁰ , MSC de tecido adiposo humanos ^{27,32,33} .	* A suplementação de cultura de MSC humanas com PRP não modifica seu fenótipo, e não provoca alterações cromossômicas ²⁷ .	* PRP, utilizado como suplemento de cultura celular, estimula a diferenciação osteogênica de MSC ^{34,35,36} , osteoblastos ^{31,37} , osteoblastos e células-tronco de polpa dentária humanas ³⁸ . * PRP, utilizado como suplemento de cultura <i>xeno-free</i> , não modifica a capacidade de diferenciação de MSC humanas ^{5,19,21,27,31} .	* PRP, utilizado como suplemento de cultura celular, estimula a produção de colágeno tipo II e proteoglicanos por MSC subcondral ^{10e} tenócitos humanos ²⁹ .	* PRP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, preserva as propriedades imunoregulatórias ^{5,21,19,26,27} .	
2.2) Plasma rico em plaquetas em forma de gel	Gel de PRP	Uma ou duas centrifugações consecutivas do sangue e adição de cálcio (3D) ^{41,42} que para ativação da cascata de coagulação ^{46,41} , vivo, e suas sinalizações célula a célula e célula a matriz extracelular ^{43,44} .	* O preparo do gel de PRP é complexo, depende da concentração adequada de plaquetas e requer um grande volume de sangue ⁹ .	* O gel de PRP estimula a proliferação <i>in vitro</i> de células endoteliais humanas ⁴² e fibroblastos humanos ⁴¹ .	* O gel de PRP favorece a formação de esferóides em culturas 3D de MSC da medula óssea humana ²⁶ , tenócitos ⁴⁰ , fibroblastos ^{26,41} humanos.	* O gel de PRP estimula a tenogênese de MSC de medula óssea ⁴⁶ . * O gel de PRP estimula a diferenciação celular de fibroblastos humanos ⁴¹ .	* O hidrogel de PRP estimula a diferenciação de MSC de medula óssea ⁴⁶ . * O gel de PRP estimula a diferenciação celular de fibroblastos humanos ⁴¹ .	* O hidrogel de PRP diminui a expressão de citocinas inflamatórias por MSC de medula óssea ²⁶ e também por fibroblastos de pele humana ³⁹ .	-	-
3) Lisado Plaquetário	LP	Duas centrifugações consecutivas do sangue, adição de epinefrina, congelamento, e choque hipotônico ⁹ .	* O LP apresenta uma maior concentração de plaquetas do que o PP ou o PRP ^{45,46,47,48} . * O LP utilizado na cultura de MSC humanas pode induzir a formação óssea ectópica ³⁴ .	* LP aumenta a proliferação de MSC humana cultivadas <i>in vitro</i> ^{49,50,51,52,53,54} . * Não há alterações cromossômicas das MSC humanas cultivadas em LP ^{5,50,51,52,54,55} .	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, mantém seu potencial de diferenciação celular ^{5,14,50,51,52,53,54} , e pode estimular a diferenciação osteogênica ³⁴ .	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, mantém seu potencial de diferenciação celular ^{5,14,50,51,52,54,55} .	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, mantém seu potencial de diferenciação celular ^{5,14,50,51,52,54,55} .	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, mantém seu potencial de diferenciação celular ^{5,14,50,51,52,54,55} .	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, mantém seu potencial de diferenciação celular ^{5,14,50,51,52,54,55} .	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, mantém seu potencial de diferenciação celular ^{5,14,50,51,52,54,55} .



Plasma Rico em Plaquetas como suplemento de cultivo celular

Dentre os diferentes produtos plaquetários, o PRP é considerado o suplemento mais promissor para cultura de células humanas destinadas ao uso clínico^{5,19,21,27,32,40}. O PRP é obtido através de uma sequência de centrifugações do sangue fresco, que tem como objetivo aumentar a concentração de plaquetas em pequeno volume do próprio plasma²¹. As vantagens de sua utilização em culturas de células humanas *xeno-free* são: 1) possibilidade de utilização de soro autólogo para preparo do implante celular; 2) redução de riscos de contaminação cruzada e reações imunológicas indesejadas para o paciente; 3) presença de fatores de crescimento que estimulam proliferação e diferenciação celular; 4) facilidade e seu preparo; 5) baixo custo de produção e 6) possibilidade de uso alogênico para cultura celular de larga escala.

O rico conteúdo liberado pelas plaquetas ativadas, presentes no PRP, é capaz de estimular a proliferação celular e a diferenciação de diversos tipos celulares, desde células adultas até as células progenitoras²². O PRP foi avaliado como suplemento de cultura *xeno-free* em diferentes tipos de células adultas humanas, tais como: fibroblastos de pele⁴¹, fibroblastos gengivais^{38,39,40}, células de ligamento periodontal³⁹, osteoblastos³⁷, condrócitos^{27,31}, mioblastos²⁸, tenócitos^{26,29} e fibrocondrócitos de menisco humano³⁷. O gel de PRP também tem sido estudado como uma forma de abrigar células cultivadas *in vitro*^{41,42,43,44}. Ele consegue criar um ambiente favorável para a formação de uma rede celular tridimensional (3D)⁴⁴ e oferece um suporte adequado para fibroblastos de pele⁴¹ e células endoteliais⁴².

Em geral, os estudos pré-clínicos avaliaram a capacidade de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular na adição do PRP no meio de cultura. Não há relatos de formação de tumores em nenhum estudo^{5,19,21,27,32,40}. O uso de PRP favorece a adesão celular no substrato da cultura e estimula a migração através da reorganização do citoesqueleto celular³⁹. O PRP não afeta o potencial de proliferação celular e, em alguns casos, pode ampliar a capacidade de expansão *in vitro* destas células humanas^{10,28,29,30,31}. Já o efeito do PRP sobre o potencial de diferenciação celular varia de acordo com o tipo de célula cultivada. Mioblastos de músculo esquelético humano não se diferenciam na presença de PRP no meio de cultura²⁸. Por outro lado, células progenitoras de tenócitos são induzidas a se diferenciar em tenócitos e passam a produzir colágeno²⁹. O mesmo comportamento é observado com células progenitoras de condrócitos. O PRP induz sua diferenciação em condrócitos e promove a formação de um tecido cartilaginoso denso e compacto, rico em colágeno tipo II e proteoglicanos¹⁰.

Outra população de células que tem sido alvo de muitos estudos que utilizam o PRP em culturas celulares *xeno-free* é a MSC^{14,27}. Os riscos de transmissão viral a partir de soro animal e o potencial de indução imunológica contra o antígeno bovino em pacientes foram relatados e suscitam preocupações sobre o uso de SFB para o preparo de MSC para pacientes submetidos à investigação clínica^{2,3,4}. Embora o meio de cultura isento de soro seja uma condição opcional para o preparo das MSC e um recurso comercialmente disponível, as características das MSC parecem serem variáveis de acordo com o tipo de meio utilizado^{58,59}.

A suplementação do meio de cultura com PRP humano tem sido recomendada para o preparo de MSC destinadas a protocolos clínicos^{14,19,60}. As justificativas para esta recomendação são: 1) o PRP adicionado ao meio de cultura não provoca ou estimula a formação de tumores ou variações genéticas ou fenotípicas das MSC cultivadas *in vitro*²⁷; 2) o PRP estimula a proliferação do MSC sem comprometer a sua capacidade de diferenciação^{5,19,27,32} e o seu imunofenótipo celular^{5,19,26,27}; 3) o PRP pode influenciar no potencial de diferenciação celular das MSC, direcionando-as para uma linhagem específica, visando atender a uma necessidade clínica^{35,39}; 4) o PRP pode diminuir a velocidade da senescência celular^{5,26,35}; 5) o PRP pode influenciar na função parácrina das MSC humanas⁶¹.

O uso do PRP autólogo é considerado ideal para preparo de células humanas destinadas a ensaios clínicos, por não oferecer riscos de rejeição imunológica para o paciente que receberá o transplante celular. Alguns estudos descrevem que as células humanas podem proliferar mais rapidamente quando suplementadas com produtos plasmáticos autólogos do que alogênicos²⁴. Já existem produtos alogênicos comercialmente disponíveis, que podem ser utilizados para produção de células em larga escala. É uma opção econômica com variação limitada no seu conteúdo, mas que pode oferecer risco de aloimunização¹⁹. As limitações que ainda existem sobre a aplicação do PRP humano em culturas celulares *xeno-free* são a necessidade de um grande volume de sangue para seu preparo e impacto de sua variabilidade biológica nas células cultivadas^{22,33}.

Uma fonte estratégica de sangue periférico e seus derivados para produção de PRP humano utilizado para suplementação de culturas celulares *xeno-free* são os bancos de sangue. Também conhecidos como hemocentros, eles constituem laboratórios especializados no armazenamento e processamento de sangue periférico que será destinado ao atendimento clínico. Em média, de 20 a 40% do sangue disponível é descartado por motivos diversos, principalmente pelo prazo de uso vencido. O índice de perdas de concentrado de plaquetas em banco de sangue públicos atinge 33%. De acordo com as diretrizes gerais para os bancos de sangue, o concentrado de plaquetas tem vida de prateleira de cinco dias. Devido a essa vida útil curta, é comum o descarte de grande quantidade deste produto após a data de transfusão recomendada^{62,63,64,65,66}. Além de evitar o desperdício, o uso do sangue e seus derivados em bancos de sangue é uma forma de assegurar que os produtos de suplemento à cultura celular tenham uma boa qualidade, pois seguem um padrão de processamento que minimiza contaminação e proliferação microbiana, e são submetidos a uma análise detalhada no ato de coleta para verificar a presença de possíveis doenças infecciosas, como sífilis, vírus HIV, hepatite B e hepatite C (recomendações descritas na Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n° 24, de 24 de janeiro de 2002).

A Lei n° 10.205, de 21 de março de 2001 e a Portaria n° 2.712, de 12 de novembro de 2013 tratam especificamente de sangue, seus componentes e derivados, assim como do regulamento técnico de procedimentos hemoterapêuticos, respectivamente^{67,68}. Elas viabilizam o uso deste material biológico, que foi captado para



fins terapêuticos e que não teve uso programado, para produção de compostos e derivados destinados a outras finalidades terapêuticas. O uso semelhante poderá ser estendido então à produção do PRP para cultivo de células humanas e pode movimentar o segmento econômico de empresas de biotecnologia, estimulando investimentos em produção de insumos para pesquisa. Os hemocomponentes excedentes são considerados como matéria prima de boa qualidade, e já foram sugeridos como “ouro líquido”^{62,66,69}, em função da alta lucratividade das empresas que investem em inovações tecnológicas.

CONCLUSÕES

Este estudo de revisão comparou os resultados encontrados em diferentes métodos de suplemento de cultura celular *xeno-free* e verificou que o plasma rico em plaquetas humano é o candidato ideal para substituir o SFB em cultura de células humanas destinadas à pesquisa clínica. Não há risco de alterações genéticas da população celular^{21,27,32}, tampouco perda de suas propriedades biológicas^{5,19,27,32} e contaminação com patógenos que poderia causar danos à saúde do paciente que receberá o transplante celular^{27,32}. Os desafios que existem, neste momento, para que o PRP seja efetivamente adotado no preparo de células humanas são: 1) padronizar processo de produção do PRP humano (número,

velocidade, gravidade e tempo de centrifugações), 2) determinar a concentração ideal de PRP humano para suplementar o meio de cultura de diferentes tipos celulares; 3) estabelecer os controles de qualidade para detectar possíveis contaminações exógenas; 4) determinar estratégias para diminuir variabilidade biológica; e 5) certificar os laboratórios e pesquisadores qualificados para oferecer tais produtos para o mercado nacional. É necessário o desenvolvimento de ensaios clínicos para avaliar a segurança e eficácia do transplante de células humanas que foram submetidas à suplementação com plasma rico em plaquetas durante o processo de cultivo e expansão celular *in vitro*. Estas condições devem ser estudadas como uma prioridade da comunidade científica e também avaliadas pelos órgãos regulatórios que fiscalizam os ensaios clínicos.

O concentrado de plaquetas destinados ao descarte nos centros de hemoterapia pode ser utilizado para produção do PRP humano. Sendo congelado, esse material de descarte pode ser guardado e processado em condições adequadas. A finalidade de seu uso final seria o cultivo de células humanas em condições *xeno-free*, para sua aplicação subsequente no cultivo de células destinadas às terapias avançadas. As autoridades competentes deverão estabelecer os parâmetros de sua manipulação e os controles de qualidade necessários para liberar o posterior uso desse produto nos procedimentos de terapias avançadas.

REFERÊNCIAS

1. MacDermott RP, Bragdon MJ. Fetal calf serum augmentation during cell separation procedures accounts for the majority of human autologous mixed leukocyte reactivity. *Behring Inst Mitt.* 1983;72(72):122-8.
2. Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica.* 2007;92(9):1208-15. <https://doi.org/10.3324/haematol.11446>
3. Xia H, Vijayaraghavan B, Belák S, Liu L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS One.* 2011;6(12): e28553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028553>
4. Giammarioli M, Ridpath JF, Rossi E, Bazzucchi M, Casciari C, De Mia GM. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals.* 2015;43(4):220-4. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.009>
5. Phetfong J, Tawonsawatruk T, Seenprachawong K, Srisarin A, Isarankura-Na-Ayudhya C, Supokawej A. Re-using blood products as an alternative supplement in the optimisation of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stem cell culture. *Bone Joint Res.* 2017;6(7):414-22. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.67.BJR-2016-0342.R1>
6. Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology.* 2013;65(5):791-3. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9633-8>
7. Hemedá H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2014;16(2):170-80. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004>
8. Swamynathan P, Venugopal P, Kannan S, Thej C, Kolkundar U, Bhagwat S et al. Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(4):88. <https://doi.org/10.1186/scrt477>
9. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC et al.; Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One.* 2012;7(10):e47559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559>
10. Kreuz PC, Krüger JP, Metzclaff S, Freymann U, Endres M, Pruss A et al. Platelet-Rich plasma preparation types show impact on chondrogenic differentiation, migration, and proliferation of human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Arthroscopy.* 2015;31(10):1951-61. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.03.033>
11. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>



12. 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>
13. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
14. Dessels C, Potgieter M, Pepper MS. Making the switch: alternatives to fetal bovine serum for adipose-derived stromal cell expansion. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 17;4:115. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00115>
15. Patrikoski M, Juntunen M, Boucher S, Campbell A, Vemuri MC, Mannerström B et al. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):27. <https://doi.org/10.1186/scrt175>
16. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A, Prockop DJ. Unique characteristics of human mesenchymal stem/progenitor cells (MSC) pre-activated in 3D cultures under different conditions. *Cytotherapy*. 2014;16(11):1486-500. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.07.010>
17. Hebert TL, Wu X, Yu G, Goh BC, Halvorsen YD, Wang Z et al. Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(7):553-61. <https://doi.org/10.1002/term.198>
18. Gharibi B, Hughes FJ. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(11):771-82. <https://doi.org/10.5966/sctm.2010-0031>
19. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016 Jan;76:371-87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.065>
20. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Jul;26(7):812-20. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04415.x>
21. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, Pacheco IC, Amaral RJC, Granjeiro JM et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jun;4(3):67. <https://doi.org/10.1186/scrt218>
22. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowanec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am*. 2012; 15;94(4):308-16. <https://doi.org/10.2106/JBJS.K.00430>
23. Bogdanova A, Berzins U, Nikulshin S, Skrastina D, Ezerta A, Legzdina D et al. Characterization of human adipose-derived stem cells cultured in autologous serum after subsequent passaging and long term cryopreservation. *J Stem Cells*. 2014;9(3):135-48. <https://doi.org/jsc.2014.9.3.135>
24. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005;23(9):1357-66. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0094>
25. Lindroos B, Boucher S, Chase L, Kuokkanen H, Huhtala H, Haataja R et al. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy*. 2009;11(7):958-72. <https://doi.org/10.3109/14653240903233081>
26. Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014; 8;4(1):52-62. <https://doi.org/10.1138/mltj/2014.4.1.052>
27. Atashi F, Jaconi ME, Pittet-Cuénod B, Modarressi A. Autologous platelet-rich plasma: a biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(3):253-62. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0206>
28. Miroshnychenko O, Chang WT, Dragoo JL. The use of platelet-rich and platelet-poor plasma to enhance differentiation of skeletal myoblasts: implications for the use of autologous blood products for muscle regeneration. *Am J Sports Med*. 2017;45(4):945-53. <https://doi.org/10.1177/0363546516677547>
29. Zhang J, Wang JK. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *Am J Sports Med*. 2010;38(12):2477-86. <https://doi.org/10.1155/2017/1075975>
30. Cavallo C, Filardo G, Mariani E, Kon E, Marcacci M, Facchini A et al. Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(5):423-9. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00726>
31. Yin W, Xu H, Sheng J, Zhu Z, Jin D, Hsu P et al. Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model. *Exp Ther Med*. 2017;14(3):2060-70. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4726>
32. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25(5):1270-8. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0627>
33. Chieragato K, Castegnaro S, Madeo D, Astori G, Pegoraro M, Rodeghiero F. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy*. 2011;13(8):933-43. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.583232>



34. Shanbhag S, Stavropoulos A, Suliman S, Hervig T, Mustafa K. Efficacy of humanized mesenchymal stem cell cultures for bone tissue engineering: a systematic review with a focus on platelet derivatives. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017; 10.1089. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0093>
35. Feng Y, Sun Y, Jia W, Zhang C. Platelet-rich plasma and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 2010;32(5):635-42. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0198-8>
36. Tavakolinejad S, Khosravi M, Mashkani B, Ebrahimzadeh Bideskan A, Sanjar Mossavi N, Parizadeh MR et al. The effect of human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Iran Biomed J*. 2014;18(3):151-7. <https://doi.org/10.6091/ibj.1301.2014>
37. Casati L, Celotti F, Negri-Cesi P, Sacchi MC, Castano P, Colciago A. Platelet derived growth factor (PDGF) contained in Platelet Rich Plasma (PRP) stimulates migration of osteoblasts by reorganizing actin cytoskeleton. *Cell Adhes Migr*. 2014;8(6): 595-602. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972785>
38. Otero L, Carrillo N, Calvo-Guirado JL, Villamil J, Delgado-Ruiz RA. Osteogenic potential of platelet-rich plasma in dental stem-cell cultures. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2017;55(7):697-702. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2017.05.005>
39. Kobayashi E, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Chappuis V, Buser D, Schaller B, et al. Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. *BMC Oral Health*. 2017;17:91. <https://doi.org/10.1186/s12903-017-0381-6>
40. Cáceres M, Hidalgo R, Sanz A, Martínez J, Riera P, Smith PC. Effect of platelet-rich plasma on cell adhesion, cell migration, and myofibroblastic differentiation in human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):714-20. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070395>
41. Rothan HA, Djordjevic I, Bahrani H, Paydar M, Ibrahim F, Abd Rahmanh N et al. Three-dimensional culture environment increases the efficacy of platelet rich plasma releasate in prompting skin fibroblast differentiation and extracellular matrix formation. *Int J Med Sci*. 2014;11(10):1029-38. <https://doi.org/10.7150/ijms.8895>
42. Zahn J, Loibl M, Sprecher C, Nerlich M, Alini M, Verrier S et al. Platelet-rich plasma as an autologous and proangiogenic cell delivery system. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1075975. <https://doi.org/10.1177/0363546510376750>
43. Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(10):1347-60. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>
44. Page H, Flood P, Reynaud EG. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res*. 2013;352(1):123-31. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1441-5>
45. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005;205(2):228-36. <https://doi.org/10.1002/jcp.20391>
46. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):121-30. <https://doi.org/10.1002/jcp.20911>
47. Bajek A, Gurtowska N, Gackowska L, Kubiszewska I, Bodnar M, Marszałek A et al. Does the liposuction method influence the phenotypic characteristic of human adipose-derived stem cells? *Biosci Rep*. 2015;35(3):e00212. <https://doi.org/10.1042/BSR20150067>
48. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*. 2010;95(6):867-74. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.011692>
49. Bernardi M, Agostini F, Chierigato K, Amati E, Durante C, Rassu M et al. The production method affects the efficacy of platelet derivatives to expand mesenchymal stromal cells in vitro. *J Transl Med*. 2017;15(1):90. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1185-9>
50. Juhl M, Tratwal J, Follin B, Søndergaard RH, Kirchhoff M, Ekblond A et al. Comparison of clinical grade human platelet lysates for cultivation of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016;76(2):93-104. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1099723>
51. Matthyssen S, Ni Dhubhghaill S, Van Gerwen V, Zakaria N. Xeno-Free Cultivation of mesenchymal stem cells from the corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(5):2659-65. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21676>
52. Mojica-Henshaw MP, Jacobson P, Morris J, Kelley L, Pierce J, Boyer M et al. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*. 2013;15(12):1458-68. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.014>
53. Trojahn Kølle SF, Oliveri RS, Glovinski PV, Kirchhoff M, Mathiasen AB, Elberg JJ et al. Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum-investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy*. 2013;15(9):1086-97. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.01.217>
54. Riis S, Nielsen FM, Pennisi CP, Zachar V, Fink T. Comparative analysis of media and supplements on initiation and expansion of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):314-24. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0148>
55. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant*. 2011;20(6):797-811. <https://doi.org/10.3727/096368910X543376>



56. Iudicone P, Fioravanti D, Bonanno G, Miceli M, Lavorino C, Totta P et al. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2014;12(1):28. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-28>
57. Gonzales VK, de Mulder EL, de Boer T, Hannink G, van Tienen TG, van Heerde WL et al. Platelet-rich plasma can replace fetal bovine serum in human meniscus cell cultures. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(11):892-9. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0009>
58. Mark P, Kleinsorge M, Gaebel R, Lux CA, Toelk A, Pittermann E et al. Human mesenchymal stem cells display reduced expression of CD105 after culture in serum-free medium. *Stem Cells Int*. 2013;2013:698076. <https://doi.org/10.1155/2013/698076>
59. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(7):1430-7.
60. Chou ML, Burnouf T. Current methods to manufacture human platelet lysates for cell therapy and tissue engineering: possible trends in product safety and standardization. *ISBT Sci Ser*. 2017;12(1):168-75. <https://doi.org/10.1111/vox.12316>
61. Willemsen JC, Spiekman M, Stevens HP, Lei B, Harmsen MC. Platelet-rich plasma influences expansion and paracrine function of adipose-derived stromal cells in a dose-dependent fashion. *Plast Reconstr Surg*. 2016;137(3):554e-65e. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000479995.04255.bb>
62. Amorim L. Aspectos técnicos da produção de Hemoderivados. Rio de Janeiro: Hemorio; 2008.
63. Novis DA, Renner S, Friedberg RC, Walsh MK, Saladino AJ. Quality indicators of fresh frozen plasma and platelet utilization. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(5):527-32.
64. Verma A, Agarwal P. Platelet utilization in the developing world: strategies to optimize platelet transfusion practices. *Transfus Apheresis Sci*. 2009;41(2):145-9. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2009.07.005>
65. Pérez Vaquero MÁ, Gorria C, Lezaun M, López FJ, Monge J, Eguizabal C et al. Optimization of the management of platelet concentrate stocks in the Basque Country using mathematical simulation. *Vox Sang*. 2016;110(4):369-75. <https://doi.org/10.1111/vox.12377>
66. Sequeira CD. Como o governo deixou estragar 55 mil bolsas de sangue. *Revista Isto É*. 2012[acesso 20 set 2017];(2234). Disponível em: https://istoe.com.br/234306_COMO+O+GOVERNO+DEIXOU+ESTRAGAR+55+MIL+BOLSAS+DE+SANGUE/
67. Brasil. Lei Nº 10.205, de 21 de março de 2001. Regulamenta o § 4o do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 22 mar 2001.
68. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 2.712, de 12 de nov de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. *Diário Oficial União*. 13 nov 2013.
69. Cohn EJ. The separation of blood into fractions of therapeutic value. *Ann Intern Med*. 1947;26(3):341-52. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-26-3-341>

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.

Fibrina rica em plaquetas: preparo, definição da qualidade, uso clínico

Platelet-rich fibrin: preparation, quality definition, clinical use

Esther Rieko Takamori*

Marcus Vinicius Telles Teixeira

Karla Menezes

Rosana Bizon Vieira Carias

Radovan Borojevic

RESUMO

Introdução: A Fibrina Rica em Plaquetas é um concentrado plaquetário, de preparo extemporâneo e uso autólogo, cuja proposta é promover uma melhor e mais rápida cicatrização e reparo das lesões cirúrgicas, tendo sido desenvolvida, inicialmente, para as cirurgias bucais. **Objetivo:** Analisar o preparo, controle de qualidade e uso clínico do PRF para compreender e discutir os aspectos práticos e regulatórios acerca da sua utilização. **Método:** Este trabalho foi elaborado como uma revisão integrativa, pelo levantamento de artigos científicos e legislação vigente sobre a utilização clínica do PRF. **Resultados:** O PRF constitui-se de uma matriz de fibrina, com grande quantidade de plaquetas, que liberam numerosos mediadores pró-regenerativos. A sua obtenção, preparo e uso ocorrem em centro cirúrgico ou consultório odontológico, cabendo ao cirurgião-dentista o compromisso com a garantia da qualidade, quanto aos procedimentos realizados. Além disso, os equipamentos e insumos utilizados devem ser compatíveis com as técnicas de preparo e uso do PRF. **Conclusões:** A utilização do PRF, pelos cirurgiões-dentistas, segue as determinações da Resolução do Conselho Federal de Odontologia - CFO nº 158/2015, de 08 de junho de 2015. Não há regulamentação para o uso de PRF pelo Conselho Federal de Medicina (CFM). A preparação e o uso do PRF não são considerados Terapia Avançada.

PALAVRAS-CHAVE: Plaquetas; Fibrina; Regeneração; Cirurgia Bucal

ABSTRACT

Introduction: Platelet Rich Fibrin is a platelet concentrate, extemporaneously prepared and autologous, whose purpose is to improve and accelerate the cicatrizing and repair of surgical lesions, originally used for oral surgeries. **Objective:** To analyze the preparation, quality control and clinical use of PRF, to understand and discuss the practical and regulatory aspects of its use. **Method:** This work was elaborated as an integrative review, by the survey of scientific articles and current legislation on the clinical use of PRF. **Results:** PRF consists of a matrix of fibrin with a large quantity of platelets, which release numerous pro-regenerative mediators. Its preparation is done in a surgical center or dental office, and the dental surgeon is responsible for the procedures and the final product. The used equipment and materials must be compatible with the standards approved for the PRF preparation methods. **Conclusion:** The use of the PRF by dental surgeons is regulated by the Resolution of the Federal Council of Dentistry (CFO) 158/2015, June 08, 2015. There is no regulation for the use of PRF by the Federal Council of Medicine (CFM). PRF preparation and use are not considered to be a part of Advanced Therapies.

Faculdade de Medicina de
Petrópolis/FASE, Petrópolis, RJ,
Brasil

KEYWORDS: Blood Platelet; Fibrin; Regeneration; Oral Surgery

* E-mail: esther.takamori@gmail.com

Recebido: 28 set 2017
Aprovado: 04 jan 2018



INTRODUÇÃO

A Fibrina Rica em Plaquetas (*Platelet Rich Fibrin - PRF*) é um concentrado plaquetário desenvolvido por Choukroun et al.¹, na França, visando a sua aplicação na cirurgia oral e maxilofacial¹. É um produto de preparo extemporâneo destinado ao uso autólogo. A sua proposta é promover uma melhor e mais rápida cicatrização e reparo das lesões cirúrgicas.

A cicatrização de feridas depende inteiramente dos mecanismos iniciais da homeostase tecidual. Quando um organismo sofre uma lesão, o primeiro tecido a reagir é o sangue, já que uma hemorragia representa um perigo iminente e potencialmente grave para o organismo. A ferida desencadeia uma cascata de reações moleculares e celulares que levam ao selamento da lesão vascular com um agregado de plaquetas. As plaquetas não somente estancam a hemorragia, formando um tampão no tecido lesado, como também são responsáveis pelo desencadeamento das próximas etapas da regeneração tecidual. Para isto, as plaquetas geram uma grande concentração de fibrinogênio e enzimas fibrinogênicas nas áreas das feridas, e liberam numerosos mediadores pró-regenerativos, particularmente os da família de fatores de crescimento².

O fibrinogênio começa a polimerizar em uma rede densa de fibrina para selar e fechar a ferida com uma sólida parede. Essa matriz de fibrina tem como propósito final a formação de coágulo³. Os fatores de crescimento plaquetários simultaneamente estimulam e ativam as células residentes vasculares e perivasculares do tecido lesado, assim como promovem a mobilização de células, no intuito de promover a regeneração tecidual. A matriz de fibrina tem também como função captar e fixar os fatores de crescimento, de concentrá-los no local de lesão, e de fornecer-los as células incorporadas nela ou migrando nela a partir de tecidos adjacentes. Assim, a coagulação não deve ser considerada como um simples reforço da função anti-hemorrágica do coágulo de plaquetas. A coagulação leva a uma rápida estruturação de um novo tecido, constituído por uma matriz densa de fibrina, além da presença de plaquetas e leucócitos. A coagulação, portanto, é o mecanismo que permite ao sangue se materializar em uma forma sólida adaptativa e polimórfica⁴.

Esse novo tecido, que é rapidamente formado, constitui a primeira matriz que atua como guia da cicatrização, além de ter a função de atrair mais plaquetas e leucócitos, aprisionar as células-tronco circulantes e permitir a migração e diferenciação das células circundantes dentro da rede de fibrina. A matriz é, então, remodelada e transformada: esse tecido transitório serve como um molde inicial para a formação de um novo tecido cicatricial. O processo de coagulação, portanto, constitui-se num importante passo para a regeneração tecidual.

No desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos, as ciências humanas frequentemente procuram mimetizar a eficiência dos mecanismos observados na Natureza⁴. Os concentrados plaquetários foram desenvolvidos para uso cirúrgico, sendo os produtos autógenos, preparados por meio da centrifugação de uma amostra de sangue autólogo do paciente⁵. O conceito dessa tecnologia é coletar e reunir os componentes mais ativos

da amostra de sangue - plaquetas (ricas em fatores de crescimento), fibrina e, por vezes, leucócitos - e prepará-los em uma forma clinicamente utilizável. Essas preparações de fibrina enriquecida em plaquetas podem ser apresentadas na forma de soluções ou géis para que sejam injetadas, ou acomodadas no sítio cirúrgico, diretamente sobre uma ferida ou em área injuriada, para regenerar os tecidos danificados⁶.

Diante da utilização do PRF como aditivo biológico em uma gama de procedimentos cirúrgicos, o objetivo do presente trabalho foi analisar artigos científicos e textos de legislações vigentes, referentes ao seu preparo, controle de qualidade e uso clínico, para compreender e discutir os aspectos práticos e regulatórios acerca da sua utilização.

MÉTODO

Este trabalho foi elaborado como uma revisão integrativa, segundo metodologia descrita por Sobral e Campos⁷, considerando o levantamento de artigos científicos e legislação vigente.

A pesquisa de literatura científica foi realizada por consulta à base de PubMed e na Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), empregando palavras-chave como: *Platelet-Rich Plasma*, Plasma Rico em Plaquetas, *Platelet-Rich Fibrin*, Fibrina Rica em Plaquetas, *Platelets*, Plaquetas, *Regeneration*, Regeneração. Foram consultadas, também, as páginas eletrônicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa - portal.anvisa.gov.br), do Ministério da Saúde do Brasil (portalsaude.saude.gov.br), do Conselho Federal de Medicina (portal.cfm.org.br/) e do Conselho Federal de Odontologia (cfo.org.br/). A referida pesquisa foi realizada no período de 04 de setembro a 05 de dezembro de 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de produtos derivados do sangue total para o selamento de feridas e estimulação do processo de cicatrização iniciou-se há mais de 40 anos. A proposta da aplicação de concentrados plaquetários na área cirúrgica originou-se de outro produto chamado selante ou adesivo de fibrina⁸.

O objetivo dos procedimentos para obtenção dos concentrados plaquetários é obter, por meio de centrifugação, os elementos do sangue que podem ser utilizados para melhorar a cicatrização e promover a regeneração tecidual⁴. Comparados com a aplicação de uma única dose supra-fisiológica de um fator de crescimento recombinante, os concentrados plaquetários têm a vantagem de oferecer no local da ferida múltiplos fatores de crescimento com ação sinérgica, em concentrações mais adequadas biologicamente e fisiologicamente⁹. Entretanto, essas concentrações devem permanecer dentro dos limites apropriados, já que o número baixo de plaquetas pode gerar um efeito subótimo, e um número alto pode inibir alguns dos processos reparadores¹⁰.

A primeira proposta de concentrados plaquetários para uso clínico inclui o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), que necessita de um anticoagulante nos tubos de coleta de sangue, e pode ser



utilizado na forma líquida ou em gel, formado após a adição de um agente ativador de coagulação e ativação das plaquetas¹¹.

Dependendo do protocolo utilizado para obtenção do PRP, o número de plaquetas concentradas varia entre 2 a 5 vezes do nível fisiológico^{8,12}. Apesar de já ser utilizado nas áreas de ortopedia¹³, medicina esportiva¹⁴ e nas cirurgias orais e maxilofaciais^{9,15}, ainda não há uma padronização geral quanto aos processos de sua obtenção.

Os protocolos propostos para obtenção do PRP são diversos, mas, de uma maneira geral, eles consistem na coleta de cerca de 20-80 mL de sangue, antes da intervenção cirúrgica, em tubos com anticoagulante, que previne a conversão de protrombina em trombina e degranação das plaquetas⁸.

No momento do preparo da intervenção terapêutica, a primeira centrifugação (rotação suave) leva o sangue total à separação em três frações: Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), camada leucoplaquetária, e a fração contendo glóbulos vermelhos. Somente a camada leucoplaquetária é usada na segunda centrifugação (rotação alta), na qual três novas frações são obtidas: PPP, PRP e glóbulos vermelhos⁸. O PRP, então, é isolado e usado para o tratamento do paciente.

O PRP pode receber ativadores, como trombina ou cloreto de cálcio, que causam degranação das plaquetas e polimerização da fibrina, com formação de um gel de plaquetas e liberação de fatores de crescimento¹⁶. Essa liberação dos fatores de crescimento inicia-se dentro dos primeiros 10 minutos, e o PRP estará pronto para ser utilizado. Aproximadamente 95% dos fatores são liberados na primeira hora após ativação do PRP. Isso significa que o PRP ativado deve ser utilizado nos primeiros minutos após a sua ativação^{12,17}. Entretanto, o PRP não ativado pode ser preservado por um período mais longo¹², seguindo os padrões e cuidados dos bancos de sangue, e usado depois da sua ativação extemporânea.

O PRF faz parte da segunda geração dos concentrados plaquetários, sendo obtido num protocolo aberto, muito simples e pouco dispendioso. Resumidamente, o sangue é coletado em tubos secos de vidro ou de plástico, sem anticoagulantes, imediatamente submetido a uma única centrifugação suave¹⁸. Três camadas são assim formadas: uma de glóbulos vermelhos no fundo, uma de PPP no sobrenadante, e uma no espaço intermediário na qual se forma o coágulo de fibrina com as plaquetas¹⁹. Esse coágulo contém plaquetas ativadas, os fatores promotores de cicatrização e os pró-regenerativos, assim como anticorpos e elementos de imunidade e resistência à infecção, presentes no sangue inicialmente coletado²⁰. Ele pode ser utilizado diretamente como um coágulo para preencher a lesão ou, após compressão, como uma membrana protetora e resistente²¹.

O processo de coagulação natural ocorre espontaneamente e permite a fácil obtenção de um coágulo rico em fibrina e contendo leucócitos, sem a necessidade de qualquer modificação bioquímica do sangue, como uso de anticoagulantes, trombina ou cloreto de cálcio⁵. Plaquetas, fibrina e leucócitos agem naturalmente em sinergia para promover a cicatrização e a regeneração tecidual²². Os leucócitos têm uma importante ação anti-infecciosa e de regulação imune e, além disso, produzem grandes quantidades

do fator de crescimento de endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) que tem importante papel na angiogênese, fundamental para o processo de regeneração tecidual.

O PRF então constitui-se numa matriz autóloga de fibrina, com uma grande quantidade de plaquetas, em que ocorre a liberação de citocinas. Espera-se que os concentrados plaquetários melhorem a cicatrização dos tecidos moles nas cirurgias orais e maxilofaciais, assim como de regeneração óssea¹¹. O uso do PRF envolve materiais minimamente manipulados, autólogos, com uso ortólogo da função das plaquetas em hemostasia, estimulação da cicatrização e regeneração tecidual. A fibrina promove o fechamento da cicatriz, e a migração de células que nela participam.

A fibrina também adsorve os fatores de crescimento, liberando-os progressivamente. O gel de PRF libera, durante mais de 7 dias, quantidades significativas de moléculas-chaves da coagulação e de cicatrização (trombospondina-1, fibronectina, vitronectina) e fatores de crescimento - particularmente fatores de crescimento derivados de plaquetas: TGFβ1 (Fator de Crescimento Transformador β), PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) e VEGF^{23,24}.

O gel de PRF assim obtido pode ser também associado com materiais orgânicos e/ou mineralizados, para promover preenchimento das regiões que sofreram ablação de tecidos. A preparação do produto final deve ser feita extemporaneamente no ambiente cirúrgico, com precauções rigorosas de assepsia. Todos os materiais que entram, nesse caso, na composição do produto final devem ser devidamente autorizados para uso clínico, e manipulados adequadamente. Esses compostos, assim como o PRF puro, podem ser utilizados na forma de membranas, *plugs* ou pastas, para promover o preenchimento de regiões que sofreram ablação de tecidos, tendo simultaneamente papel na hemostasia do sítio cirúrgico em que são utilizadas e atuação no processo de regeneração do mesmo. Dentre as indicações de uso, nas cirurgias orais e maxilo-faciais, destacam-se: manejo de tecidos moles em área estética, tratamento das perfurações de membrana em elevação de assoalho de seio maxilar, proteção e estabilização de materiais de enxerto (particulados ou em bloco), cobertura de raízes de um ou mais dentes com recessão gengival, associação a implantes^{15,25}. Miron et al.²⁶ realizaram uma revisão sistemática, seguindo as orientações do Prisma (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*)²⁷, na qual avaliaram o potencial regenerativo/reparativo do PRF numa variedade de situações clínicas em odontologia. Foram incluídos 35 estudos, dentre os quais: 10 sobre defeitos intraósseos, três sobre defeitos de furca, 13 sobre recessão gengival, quatro sobre regeneração óssea guiada e cinco sobre levantamento de seio maxilar. O PRF melhorou a formação de tecido mole e limitou as mudanças dimensionais pós-extração dentária. Entretanto, verificou-se a ausência de estudos bem conduzidos, que pudessem demonstrar o papel do PRF na regeneração de tecido ósseo, o que aponta para a necessidade de estudos clínicos randomizados para avaliação do PRF na formação de osso.

Em estudos clínicos, na área médica, a aplicação de PRF promoveu redução no tamanho²⁸ e aumento de cicatrização e fechamento das feridas em úlceras crônicas²⁹. Mahapatra et al.³⁰



verificaram aumento no número de folículos capilares, após aplicação da matriz de PRF em conjunção com transplante de unidades foliculares, no tratamento de alopecia androgênica.

Desde o primeiro protocolo, estabelecido por Choukroun et al.¹, outros vem sendo desenvolvidos, com a proposta de modificar a estrutura de fibrina, assim como das células que fazem parte da matriz obtida, no intuito de melhorar a atuação do PRF nos processos de regeneração tecidual. Modificações têm sido propostas, quanto à força relativa e ao tempo de centrifugação, pois são elementos-chave para modificar a estrutura e composição das matrizes de PRF^{31,32,33}.

No protocolo do PRF, desenvolvido inicialmente por Choukroun, o sangue é submetido à centrifugação em torno de 2.700-3.000 rpm por 12 min ou, aproximadamente a 400 g, imediatamente após a coleta^{34,35}.

O *Advanced PRF* (A-PRF) foi desenvolvido com a proposta de aumentar o número de linfócitos B e T, além de plaquetas na rede de fibrina. Para tanto, utilizaram uma velocidade de centrifugação mais baixa (1.500 rpm) que a do protocolo inicial do PRF, e o tempo de 14 min^{31,36}.

Ghanaati et al.³¹ compararam as células obtidas e a sua distribuição na matriz de fibrina, obtida a partir dos protocolos para PRF e A-PRF. Verificaram que os tipos celulares foram diferentemente distribuídos, em função das diferentes forças centrífugas utilizadas. No coágulo de PRF, formou-se uma densa rede de fibrina, com espaços mínimos entre as fibras. Foram observadas células por todo o coágulo, diminuindo, entretanto, nas partes distais do mesmo. Os coágulos obtidos com o protocolo do A-PRF mostraram uma estrutura mais frouxa, com mais espaços interfibrinosos, e mais células presentes nos mesmos. Elas foram distribuídas mais uniformemente ao longo do coágulo em comparação com PRF, sendo observadas algumas células na porção mais distal do coágulo. Linfócitos T e B, células tronco e monócitos foram encontrados em ambos os grupos dentro dos primeiros 25%-30% da parte proximal do coágulo. Plaquetas foram observadas por todo o coágulo em ambos os grupos, apesar de no grupo A-PRF, mais plaquetas terem sido verificadas na parte distal, distante da porção leucoplaquetária.

A diminuição da velocidade de rotação e o aumento no tempo de centrifugação no grupo A-PRF, proporcionaram uma maior presença de granulócitos neutrófilos na parte distal do coágulo. No grupo PRF, a maior parte dos neutrófilos, foi encontrado na interface entre os glóbulos vermelhos e a camada leucoplaquetária. Espera-se que eles contribuam para a diferenciação de monócitos em macrófagos e criem, assim, um relacionamento sinérgico entre as células, permitindo estimulação mútua para a regeneração tecidual³¹.

Outra modificação do A-PRF foi proposta por Fujioka-Kobayashi et al.³⁷, em que a velocidade e o tempo de centrifugação sugeridos foram de 1.300 rpm e 8 min. Segundo os autores, esse protocolo modificado, denominado A-PRF +, possibilita o aumento das células ancoradas na matriz de PRF.

Mourão et al.³⁸ propuseram uma alternativa de produção de fibrina rica em plaquetas para utilização na sua forma líquida (injetável) ou polimerizada (coágulo). Para produzir o i-PRF,

o sangue é coletado em tubos de plástico sem anticoagulante e centrifugado a 3.300 rpm por 2 min. Outro protocolo proposto para a obtenção de PRF líquido, consiste na centrifugação dos tubos por 2.400-2.700 rpm por 2 min. O sobrenadante coletado é denominado Concentrado de Fatores de Crescimento (*Concentrated Growth Factors - CGF*)³⁹.

Verifica-se que diferentes estruturas da matriz de fibrina, assim como das células ancoradas nas mesmas, podem ser obtidas em função da utilização de diferentes protocolos, nos quais pode-se variar a velocidade, bem como o tempo de centrifugação. Para a definição do protocolo mais adequado a ser utilizado, deve-se considerar cada situação clínica, especificamente.

Além disso, as características da centrífuga podem interferir na obtenção do coágulo de PRF⁴⁰, o que exige especial atenção, quanto à aplicação de um determinado protocolo, numa centrífuga diferente da qual ele foi desenvolvido.

A Resolução do Conselho Federal de Odontologia n° 158, de 08 de junho de 2015⁴¹ regulamenta o uso do PRP e da PRF, denominados como Agregados Plaquetários Autólogos, para fins não transfusionais no âmbito da Odontologia. A porção do sangue que contém os componentes plaquetários, sem adição de qualquer produto, inclusive anticoagulante ou coagulante, denomina-se PRF. Considera-se o PRP como a porção do sangue que contém os componentes plaquetários, com a adição de qualquer produto, inclusive anticoagulante ou coagulante. De acordo com o Parágrafo 3, o processamento do sangue humano para obtenção do PRP em sistema fechado e as manipulações do sangue para a obtenção da PRF podem ser realizadas em centro cirúrgico ou consultório odontológico por cirurgião-dentista devidamente habilitado, em conformidade com a RDC da Anvisa n° 63, de 25 de novembro de 2011⁴², que dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Saúde, ou a que vier a substituí-la ou complementá-la. De acordo com essa Resolução, Capítulo II, Das Boas Práticas de Funcionamento, Seção I - Do gerenciamento da qualidade, Art. 5°:

O serviço de saúde deve desenvolver ações no sentido de estabelecer uma política de qualidade envolvendo estrutura, processo e resultado na sua gestão dos serviços. Parágrafo único. O serviço de saúde deve utilizar a Garantia da Qualidade como ferramenta de gerenciamento.

Na sua Seção III, Das Condições Organizacionais, Art. 17:

O serviço de saúde deve prover infraestrutura física, recursos humanos, equipamentos, insumos e materiais necessários à operacionalização do serviço de acordo com a demanda, modalidade de assistência prestada e a legislação vigente.

Ainda, de acordo com a sua Seção VIII, Da Gestão de Tecnologias e Processos, Art. 54.:

O serviço de saúde deve realizar o gerenciamento de suas tecnologias de forma a atender as necessidades do serviço mantendo as condições de seleção, aquisição, instalação, funcionamento, distribuição, descarte e rastreabilidade.



Sendo assim, cabe ao cirurgião-dentista, responsável pelo serviço de saúde, o cumprimento da RDC nº 63/2011⁴², da qual destacamos o compromisso com a garantia da qualidade, quanto aos procedimentos realizados. Além disso, os equipamentos e insumos utilizados, devem ser compatíveis com as técnicas de preparo e utilização do PRF.

Para a obtenção do PRP em sistema fechado, os kits a serem utilizados devem ser registrados como produtos para saúde, de acordo com a RDC da Anvisa nº 185, de 22 de outubro de 2001⁴³, devendo ser cumpridos os requisitos de segurança e sua eficácia⁴⁴.

De acordo com o Parágrafo 4º da Resolução CFO nº 158/2015⁴¹, o processamento do sangue humano em sistema aberto, para obtenção de PRP para uso autólogo em Odontologia, deverá ser realizado exclusivamente em Centros de Processamento Celular (CPC), devidamente licenciados pela Vigilância Sanitária competente nos termos da legislação vigente e mediante acordo entre os serviços por meio de documento escrito que comprove terceirização. Nesse caso, devem ser seguidas as determinações, assim como os controles, definidos pela RDC da Anvisa nº 214, de 7 de fevereiro de 2018⁴⁵, que podem incluir a contagem de plaquetas e o controle microbiológico do material a ser aplicado. O protocolo de obtenção do PRP envolve a manipulação mínima do sangue do paciente, o que determina, portanto, que ela seja realizada em Centro de Processamento Celular. De acordo com a RDC nº 214, de 7 de fevereiro de 2018, os Centros de Tecnologia Celular passam a ser denominados Centros de Processamento Celular.

Segundo o Parecer nº 20/2011 do Conselho Federal de Medicina (CFM)⁴⁶, o uso do PRP em procedimentos não hemoterápicos é considerado experimental. A Resolução CFM nº 1.499, 26 de agosto de 1998⁴⁷, proíbe aos médicos a prestação de serviços de práticas terapêuticas não reconhecidas pela comunidade científica. De acordo com a Resolução CFM nº 2.128, 17 de julho de 2015⁴⁸, a prática do uso do PRP, ainda, é considerada como experimental e o seu uso restringe-se à experimentação clínica, dentro dos protocolos do sistema Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), a ser conduzida em instituições devidamente habilitadas para tal fim e que atendam às normas do Ministério da Saúde para o manuseio e uso de sangue e hemoderivados no país.

Quanto ao PRF, o CFM não regulamenta ou faz menção específica ao uso do PRF. Dessa maneira, a utilização clínica do PRF, na área

médica, deve ser realizada, como pesquisa clínica, devendo ser aprovada pelo sistema CEP/CONEP.

A revolução tecnológica na pesquisa biomédica tem levado ao desenvolvimento de novos procedimentos clínicos e produtos médicos biológicos para uso humano, atualmente classificados como “Terapias Avançadas”.

A Portaria nº 1.731, de 9 de setembro de 2016 da Anvisa⁴⁹ define as Terapias avançadas como: (I) Produtos de terapia celular avançada; (II) Produtos de engenharia de tecidos; e (III) Produtos de terapia gênica. São produtos constituídos de células somáticas ou seus derivados não quimicamente definidos, que possuem a finalidade de obter propriedades terapêuticas ou preventivas, por meio de seus modos de ação principais de naturezas metabólicas, farmacológicas e/ou imunológicas, para uso autólogo ou alogênico, em humanos, sendo que foram submetidos à manipulação extensa ou que desempenham no receptor uma função distinta da desempenhada no doador. A manipulação de produtos de terapia avançada deve ocorrer em Centro de Processamento Celular, de acordo com a RDC nº 214/2018 da Anvisa⁴⁵, que dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, ou de acordo com os documentos que venham substituí-la.

A preparação do PRF a partir do sangue do paciente e o seu uso terapêutico são realizados no mesmo ato cirúrgico. O PRF constitui-se num adjuvante cirúrgico, tendo a função de um coágulo sanguíneo melhorado, sendo isso uma maneira de mimetizar e amplificar um fenômeno natural: a coagulação sanguínea e a sua participação na regeneração tecidual⁴. A diferença entre o coágulo de sangue natural e o PRF é que o último é mais homogêneo e estável, fácil de manusear e colocar no local indicado, e passível de associação com materiais sintéticos ou biógenos²⁵. O material é obtido e se destina para uso autólogo, após coleta do sangue e centrifugação, mantendo a sua função primária de hemostasia e coagulação. A sua obtenção consiste numa manipulação mínima, nos tubos de coleta do sangue para formação de gel.

CONCLUSÕES

A utilização do PRF, pelos cirurgiões-dentistas, segue as determinações da Resolução CFO 158/2015⁴¹. Não há regulamentação para o uso de PRF pelo CFM. A preparação e o uso do PRF não são considerados uma terapia avançada.

REFERÊNCIAS

1. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C VA. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie*. 2001;42:55-62.
2. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37(5):1528-42. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
3. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936(1):11-30. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03491.x>
4. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1121-30. <https://doi.org/10.2174/138920112800624292>
5. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>



6. Kumar KR, Genmorgan K, Abdul Rahman SM, Rajan MA, Kumar TA, Prasad VS. Role of plasma-rich fibrin in oral surgery. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8(Suppl 1):S36-8. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.191963>.
7. Sobral FR, Campos CJ. The use of active methodology in nursing care and teaching in national productions: an integrative review. *Rev Esc Enferm USP.* 2012;46(1):208-18. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342012000100028>
8. Mihaylova Z, Mitev V, Stanimirov P, Isaeva A, Gateva N, Ishkitiev N. Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. *Acta Odontol Scand.* 2017;75(1):1-11. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1236985>
9. Agrawal AA. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World J Clin Cases.* 2017;5(5):159-71. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v5.i5.159>
10. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34(4):665-71. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010>
11. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W et al. Regenerative potential of leukocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2017;44(1):67-82. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12643>
12. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638-46. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4)
13. Laver L, Marom N, Dnyanesh L, Mei-Dan O, Espregueira-Mendes J, Gobbi A. PRP for degenerative cartilage disease: a systematic review of clinical studies. *Cartilage.* 2017;8(4):341-64. <https://doi.org/10.1177/1947603516670709>
14. Yoshida M, Marumo K. An autologous leukocyte-reduced platelet-rich plasma therapy for chronic injury of the medial collateral ligament in the knee: a report of 3 successful cases. *Clin J Sport Med.* 2017 Nov 29. <https://doi.org/10.1097/JSM.0000000000000515>
15. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1207-30. <https://doi.org/10.2174/138920112800624391>
16. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet Alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009;23(4):177-89. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>
17. Somani R, Zaidi I, Jaidka S. Platelet-rich plasma: a healing aid and perfect enhancement factor: review and case report. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2011;4(1):69-75. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1085>
18. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol.* 2010;81(4):546-55. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090531>
19. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR. Role of platelet rich fibrin in wound healing: a critical review. *J Conserv Dent.* 2013;16(4):284-93. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.114344>
20. Fioravanti C, Frustaci I, Armellini E, Condò R, Arcuri C, Cerroni L. Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. *Oral Implantsol.* 2016;8(4):96-113. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.114344>
21. Khorshidi H, Raoofi S, Bagheri R, Banihashemi H. Comparison of the mechanical properties of early leukocyte- and platelet-rich fibrin versus PRGF/ endoret membranes. *Int J Dent.* 2016;2016:1849207. <https://doi.org/10.1155/2016/1849207>
22. Dohan Ehrenfest DM, Sammartino G, Shibli JA, Wang H, Zou D, Bernard J. Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma - PRP, or Platelet-Rich Fibrin - PRF): the international classification of the POSEIDO. *POSEIDO J.* 2013;1(1):17-27.
23. Dohan Ehrenfest DM, Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors.* 2009;27(1):63-9. <https://doi.org/10.1080/08977190802636713>
24. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1145-52. <https://doi.org/10.2174/138920112800624382>
25. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1231-56. <https://doi.org/10.2174/138920112800624472>
26. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2017;21(6):1913-27. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2133-z>
27. Swartz MK. The PRISMA statement: a guideline for systematic reviews and meta-analyses. *J Pediatr Health Care.* 2011;25(1):1-2. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2010.09.006>
28. Somani A, Rai R. Comparison of efficacy of autologous platelet-rich fibrin versus saline dressing in chronic venous leg ulcers: a randomised controlled trial. *J Cutan Aesthet Surg.* 2017;10(1):8-12. https://doi.org/10.4103/JCAS.JCAS_137_16



29. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM, Quirynen M. Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets*. 2017 Jul 20. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1327654>
30. Mahapatra S, Kumar D, Subramanian V, Chakrabarti SK, Deb KD. Study on the efficacy of platelet-rich fibrin matrix in hair follicular unit transplantation in androgenetic alopecia patients. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016;9(9):29-35.
31. Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-89. <https://doi.org/10.1563/aaaid-joi-D-14-00138>
32. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017 Mar. <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0785-7>
33. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017 Mar. <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0767-9>
34. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e45-50. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009>
35. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e37-44. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>
36. Shah R, M G T, Thomas R, Mehta DS. An update on the protocols and biologic actions of platelet rich fibrin in dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2017;25(2):64-72. https://doi.org/10.1922/EJPRD_01690Shah09
37. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol*. 2017;88(1):112-21. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160443>
38. Mourão CF, Valiense H, Melo ER, Mourão NB, Maia MD. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note [Internet]. *Rev Col Bras Cir*. 2015;42(6):421-3. <https://doi.org/10.1590/0100-69912015006013>
39. Sohn DS, Huang B, Kim J, Park WE. Utilization of autologous concentrated growth factors (CGF) enriched bone graft matrix (sticky bone) and CGF-enriched fibrin membrane in implant dentistry. *J Implant Adv Clin Dent*. 2015;7(10):11-8.
40. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, 2017; early online: 1-14. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812>
41. Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO Nº 158, de 8 de junho de 2015. Regulamenta o uso de Agregados Plaquetários Autólogos para fins não transfusionais no âmbito da Odontologia. *Diário Oficial União*. 6 jul 2015.
42. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução-RDC Nº 63, de 25 de novembro de 2011. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Saúde. *Diário Oficial União*. 25 nov 2011.
43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução-RDC Nº 185, de 22 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Diário Oficial União*. 6 nov 2001.
44. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Nota Técnica Nº 012/2015 GSTCO/GGPBS/SUMED/ANVISA Referência. Utilização de Plasma Rico em Plaquetas - PRP para fins terapêuticos não transfusionais. *Diário Oficial União*. 23 jan 2015.
45. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 214, de 7 de fevereiro de 2018. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 22 fev 2018.
46. Conselho Federal de Medicina. Parecer Nº 20/2011. PRP: plasma rico em plaquetas. *Diário Oficial União*. 12 jul 2011.
47. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM Nº 1.499, de 26 de agosto de 1998. *Diário Oficial União*. 3 set 1998.
48. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM Nº 2.128, de 17 de julho de 2015. Considerar o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) como procedimento experimental, só podendo ser utilizado em experimentação clínica dentro dos protocolos do sistema CEP/CONEP. *Diário Oficial União*. 29 out 2015.
49. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Portaria Nº 1.731, de 9 de setembro de 2016. Institui a Câmara Técnica de Terapias Avançadas (CAT). *Diário Oficial União*. 12 set 2016.

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.

Utilização de plaquetas e de produtos derivados de plaquetas humanas em terapias avançadas

Use of platelets and human platelet-derived products in advanced therapies

Marcus Vinicius Telles Teixeira*

Esther Rieko Takamori

Karla Menezes

Rosana Bizon Vieira Carias

Radovan Borojevic

RESUMO

Introdução: As plaquetas têm um papel central no processo da resposta tecidual à injúria, atuando na hemostasia primária e na coagulação, e liberando de maneira coordenada as moléculas bioativas importantes para a angiogênese e para a regeneração tecidual. O uso clínico não transfusional de produtos derivados de plaquetas, como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), baseia-se na sua habilidade de maximizar o processo de regeneração celular, em lesões com dificuldades de reparo natural. **Objetivo:** Esta revisão aborda as características e potencialidades do uso clínico de plaquetas e seus derivados e discute seu arcabouço legislativo no contexto brasileiro. **Método:** Foram consultadas as bases de dados PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde, páginas eletrônicas da Anvisa e do ministério da Saúde, entre setembro 2017 e janeiro de 2018. **Resultados:** O PRP é produto derivado de plaquetas que não pode ser quimicamente definido, e o seu uso clínico aqui discutido não é ortólogo. **Conclusões:** Dessa maneira, podemos considerar a aplicação do PRP como uma Terapia Celular Avançada, sendo fundamental padronizar protocolos, estabelecer critérios de controle de qualidade (rastreadibilidade, eficácia e fármaco-vigilância), tornando seu uso devidamente controlado pelos órgãos competentes, com maior segurança na sua utilização.

PALAVRAS-CHAVE: Plaquetas; Plasma Rico em Plaquetas; Regeneração; Medicina Regenerativa

ABSTRACT

Introduction: Platelets have a central role in the tissue response to injury, in hemostasis and clot formation. They also release rapidly and in orchestrated order bioactive molecules, important for angiogenesis and for tissue regeneration. Non-transfusional clinical use of platelet-derived products, such as Platelet Rich Plasma (PRP), is based on their ability to maximize cellular regeneration in lesions that have repair difficulties. **Objectives:** This review addresses the characteristics and the potential clinical use of platelets and their derivatives and discusses the legislative framework of their use in the Brazilian context. **Method:** The databases of PubMed, Brazilian Virtual Health Library, electronic pages of Anvisa and the Brazilian Ministry of Health were consulted between September 2017 and January 2018. **Results:** PRP is a platelet-derived product that cannot be chemically defined, and its proposed clinical uses are not orthologous applications. **Conclusions:** We can thus consider that the applications of PRP are Advanced Cell Therapies. Therefore, it is mandatory to standardize protocols and establish quality control criteria - such as traceability, efficacy and pharmacovigilance - so that their use can be properly controlled by the competent regulatory organs, guaranteeing safety in their use.

KEYWORDS: Blood Platelet; Platelet-Rich Plasma; Regeneration; Regenerative Medicine

Faculdade de Medicina de
Petrópolis/FASE, Petrópolis RJ, Brasil

* E-mail: mtellesteixeira@gmail.com

Recebido: 12 out 2017

Aprovado: 29 jan 2018



INTRODUÇÃO

Plaquetas são corpúsculos celulares sem núcleo, circulantes no sangue, derivadas dos megacariócitos da medula óssea. Estima-se que 70% das plaquetas estejam presentes no fluxo sanguíneo e 30% no baço, tendo uma vida útil média de 10 dias. As plaquetas têm um papel central no processo da resposta tecidual à injúria, atuando em todas as suas etapas: coagulação, inflamação, remodelamento e cicatrização. Embora as plaquetas circulantes possuam morfologia discoide simples, elas apresentam uma complexa estrutura de grânulos, canais e organelas capazes de liberar rápida e orquestradamente moléculas bioativas, importantes nos processos da resposta a injúrias e cicatrização. Sua membrana celular é altamente rica em glicoproteínas e receptores de transdução de sinais moleculares, o que possibilita a comunicação e interação com diversas moléculas e células¹.

Origem das plaquetas

As plaquetas (trombócitos) formam-se através da fragmentação citoplasmática de megacariócitos na corrente sanguínea. Ainda na medula óssea, as células-tronco hematopoiéticas (hemocitoblastos) sofrem processos de proliferação e diferenciação celular que dão origem a todos os precursores das células sanguíneas circulantes². A partir das células progenitoras mieloides, derivadas dos hemocitoblastos, originam-se granulócitos, eritrócitos, megacariócitos, monócitos e outras células mieloides.

Em resposta às citocinas, principalmente a trombopoetina, o progenitor mielóide diferencia-se no nicho medular em células altamente proliferativas, diploides denominadas megacarioblastos. Estes iniciam um processo de duplicação endomitótica, no qual ocorre um aumento do volume citoplasmático e o número de núcleos e organelas, porém sem divisão celular. Nesta condição, a célula poliploide (promegacariócito) torna-se altamente granulada com um tamanho de 5 a 10 vezes maior que uma célula comum (< 50-100 microns de diâmetro). Estas células contêm múltiplos núcleos, altos níveis de RNA, ribossomos proeminentes, rico retículo endoplasmático rugoso, peroxidase plaquetária, além de grânulos alfa, grânulos densos e membrana de demarcação primária. O megacariócito, agora maduro, forma nos vasos sinusoides venosos projeções citoplasmáticas protoplaquetárias que darão origem às plaquetas circulantes³ (Figura 1).

Medula Óssea

Produção e liberação das plaquetas

Profundas modificações estruturais do citoesqueleto de megacariócitos são necessárias para a produção das plaquetas. Uma extensa demarcação interna do citoplasma dos megacariócitos maduros serve de reservatório para a formação das plaquetas em extensões

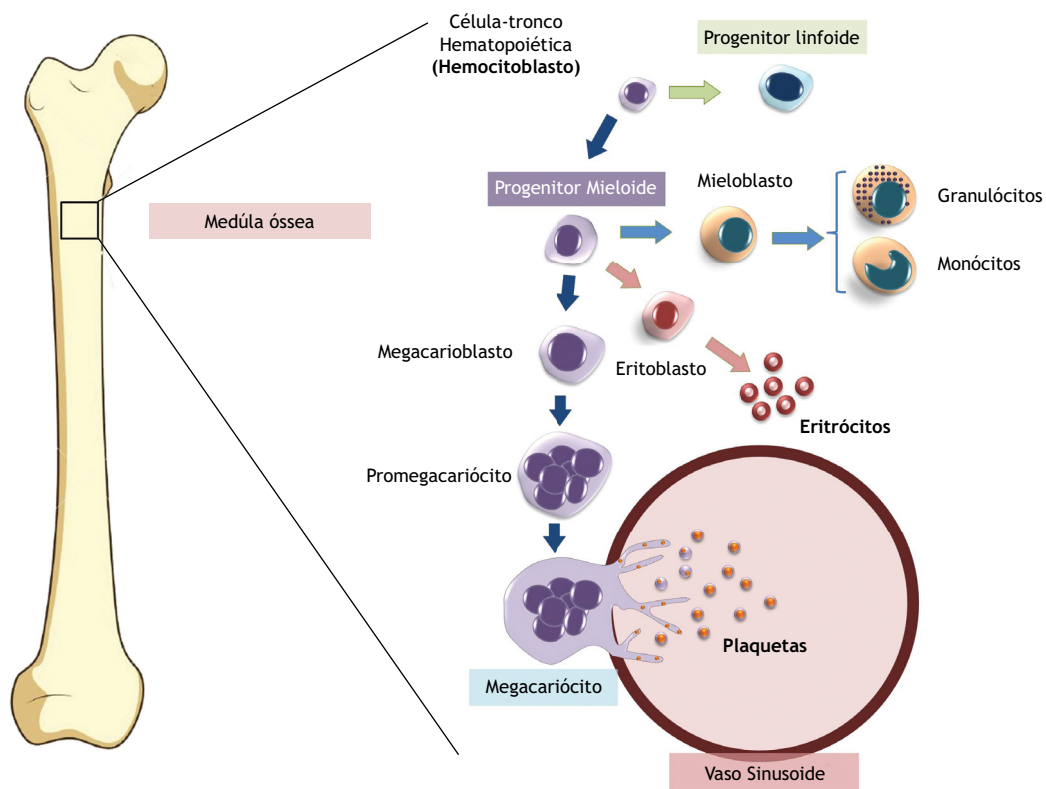


Figura. Resumo da gênese dos megacariócitos e liberação de plaquetas. Na medula óssea, as células-tronco hematopoiéticas diferenciam-se em progenitores mieloides. Estes progenitores, sofrem diferenciações em megacarioblastos, e esses, posteriormente, em megacariócitos. Por fim, megacariócitos maduros lançam projeções protoplaquetárias para dentro do vaso sinusoide, dentro do qual as plaquetas são liberadas na corrente sanguínea.



denominadas projeções protoplaquetárias. Enquanto algumas proteínas plaquetárias, como o Fator de Von Willebrand e receptores de fibrinogênio, são formadas na membrana dos megacariócitos, parte das organelas e proteínas empacotadas nos grânulos migram do citoplasma para os prolongamentos protoplaquetários^{2,3}.

Atualmente são aceitos dois modelos que explicam a formação das plaquetas. No primeiro, a liberação das plaquetas dá-se por brotamento das pontas das projeções protoplaquetárias, como linhas de montagem. Assim, as projeções protoplaquetárias avançam pelos espaços sinusoidais e por onde se separam em plaquetas individuais com ajuda do fluxo sanguíneo. No segundo modelo, territórios pré-formados com as membranas internas dos megacariócitos demarcam as plaquetas já empacotadas ainda dentro do citoplasma. Assim elas são liberadas pela fragmentação direta do citoplasma nas projeções protoplaquetárias².

Função primária das plaquetas

A função primária das plaquetas é desencadear um conjunto de respostas a uma lesão vascular, com o objetivo de salvaguardar a integridade dos vasos sanguíneos, exercendo um papel central no processo de contenção urgente do extravasamento sanguíneo (hemostase). As plaquetas circulam dentro dos vasos em contato ocasional com as paredes vasculares. O endotélio que cobre as paredes normais é contínuo, coberto por glicoproteínas que impedem a aderência das plaquetas, mantendo-as em circulação livre. Uma lesão aguda do endotélio causa a exposição do colágeno subendotelial, extremamente aderente para as plaquetas⁴. Tal aderência dá-se através da ligação do Fator de Von Willebrand, associado com o colágeno subendotelial, no seu ligante na membrana de superfície das plaquetas. Isto promove imediatamente a adesão e a ativação das plaquetas, seguida pela mobilização local de mais plaquetas circulantes. A liberação na circulação do Fator Tecidual pela camada subendotelial promove também a rápida formação do coágulo pela ativação da cascata de trombina, a quebra do fibrinogênio e a formação da rede de fibrina (via extrínseca de coagulação). Forma-se assim o tampão plaquetário (trombo) com a função da hemostasia primária⁵.

Durante sua ativação, as plaquetas secretam diversas substâncias importantes para a manutenção do trombo e para o início do processo de inflamação tecidual. Dos grânulos-alfa são liberados principalmente: fator plaquetário IV, fatores de coagulação e inibidor do ativador plasminogênio e fator de Von Willebrand. Acompanham as proteínas adesivas, trombospondina e vitronectina, que captam e ativam novas plaquetas da circulação para o coágulo em formação. Dos grânulos densos são liberados ATP, ADP e cálcio. A agregação plaquetária também induz as sinalizações intracelulares envolvidas em respostas celulares, como a produção de serotonina, ADP e TXA₂ amplificando as respostas plaquetárias. Outras citocinas liberadas pelos grânulos alfa atuam na sinalização pró-inflamatória, guiando a ativação e diferenciação de monócitos, e adesão de neutrófilos.

Função secundária das plaquetas

No contexto tardio e crônico, as plaquetas estão envolvidas nos processos de recrutamento de células imunitárias, na formação

de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e no processo de remodelamento e regeneração tecidual. As plaquetas ativadas liberam uma plethora de fatores estimuladores do metabolismo e da proliferação, tanto das células residentes quanto das mobilizadas da circulação sanguínea. Esses fatores são conhecidos como “fatores de crescimento celular”, destinados a promover o reparo e regeneração dos tecidos lesionados.

Enquanto a ativação da coagulação e formação da rede de fibrina é rápida e de curta duração, a produção de fatores de crescimento é longa, mantida pelos fatores inflamatórios, e pela ativação em cascata de plaquetas mobilizadas da circulação. Os fatores produzidos associam-se à rede de fibrina, colágeno e glicoproteínas da matriz extracelular, mantendo este processo de regeneração a longo prazo. Enquanto os fatores pró-inflamatórios iniciam o processo de inflamação local, seguem-se as ações dos fatores plaquetários neoangiogênicos, que estimulam a proliferação do endotélio e formação de novos vasos capilares. Além da alimentação e oxigenação dos tecidos, as redes vasculares garantem o suprimento das células progenitoras circulantes que permeiam fluidos biológicos. Os fatores estabilizadores dos vasos mobilizam os pericitos (células progenitoras residentes que migram pelo lado abluminal das paredes vasculares) e induzem a proliferação das células murais dos vasos maiores. Por fim, os fatores de crescimento envolvidos com a proliferação de vários tipos celulares garantem uma regeneração tecidual ampla.

A garantia da hemostasia (função primária) e a promoção do reparo e regeneração tecidual (função secundária) exercem as suas atividades em contextos e tempos distintos. A função primária atua essencialmente num contexto agudo e imediato, enquanto a segunda função atua em um contexto crônico e tardio. Ambos os casos podem envolver componentes semelhantes, mas a lógica e sequência operacionais são distintas, embora complementares. Não é surpreendente que a produção e a liberação coordenada desse conjunto de fatores plaquetários de regeneração tecidual chamem a atenção, podendo ser aproveitada em muitas áreas de medicina regenerativa. As plaquetas sanguíneas, a sua fonte, podem ser usadas em vários contextos como doadoras de fatores de crescimento. Por isto, o seu uso potencial em clínica médica e em cuidados da saúde segue a mesma dicotomia. Deste modo, a presente revisão pretende abordar as características e potencialidades do uso clínico de plaquetas e seus derivados.

MÉTODO

Este trabalho foi elaborado como uma revisão integrativa, considerando o levantamento de artigos científicos com o objetivo de compreender a utilização do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) nas terapias avançadas e discutir o arcabouço legislativo desta terapia no contexto brasileiro. A pesquisa de literatura científica foi consultada na base de dados PubMed, e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), sob as palavras-chave como: Plasma Rico em Plaquetas, *Platelet-rich Plasma*, Plaquetas, *Platelets*, Regeneração, *Regenerative medicine*, *Therapy*. Também foram consultadas as páginas eletrônicas da Agência Nacional de Vigilância



Sanitária (Anvisa - portal.anvisa.gov.br) e do ministério da Saúde do Brasil (portalsaude.saude.gov.br). A referida pesquisa foi realizada no período entre 07 a 14 de setembro de 2017 e entre 15 a 23 de janeiro de 2018.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uso transfusional de plaquetas

O uso clínico de plaquetas é um procedimento bem estabelecido na profilaxia e tratamento de problemas derivados da trombocitopenia ou anormalidades das funções plaquetárias⁶. No contexto do controle de hemostasia e coagulação, a intervenção terapêutica envolve o concentrado de plaquetas. Estima-se que nos Estados Unidos, cerca de 2,2 milhões de unidades de concentrado de plaquetas são transfundidas anualmente. O Concentrado de Plaquetas (CP) é um hemocomponente obtido do fracionamento do sangue total, ou diretamente por meio de aférese. No Brasil, as diretrizes do Ministério da Saúde⁷ recomendam que cada unidade de CP (randômicas) contenha aproximadamente $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas em cerca de 50 a 60 mL de plasma. Nestes casos as plaquetas são obtidas a partir de uma unidade de sangue total⁸. No caso de plaquetaféreses, os CP são obtidos por aférese e contêm cerca de $3,0 \times 10^{11}$ plaquetas em 200 a 300 mL de plasma. O seu uso terapêutico transfusional se aplica nos casos de plaquetopenia ou anormalidades da função plaquetária, assim como em pacientes cirúrgicos com sangramento ativo, em transfusões maciças, circulação extracorpórea, coagulação intravascular disseminada. O uso profilático aplica-se aos pacientes com aplasias medulares, submetidos à quimio ou radioterapia, e naqueles entrando em procedimentos cirúrgicos críticos, mas também em cirurgias oftalmológicas e neurológicas⁷.

O uso do CP por infusão vascular tem a sua função como suplemento da quantidade e/ou qualidade das plaquetas já existentes, e é caracterizada como uma terapia ortóloga e convencional. Fica evidente que o uso da transfusão de plaquetas nestes procedimentos deve-se unicamente a função primária das plaquetas: a hemóstase. Este produto está sob responsabilidade dos centros de hemoterapia, e essas terapias são submetidas aos controles de qualidade desses produtos, num contexto de terapias alogênicas. A RDC n° 57, de 16 de dezembro de 2010 da Anvisa⁹ determina o regulamento sanitário para serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. A Portaria Ministerial n° 1353/2011¹⁰ aprova o regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos.

Plasma Rico em Plaquetas

Nas últimas décadas, o número de estudos clínicos envolvendo o uso experimental de outro tipo de CP tem sido crescente, definido como PRP. Somente na plataforma americana *clinical trials* (www.clinicaltrials.gov), o PRP (platelet-rich plasma) é objeto de estudo em cerca de 300 ensaios clínicos em cirurgias ortopédicas, plásticas, maxilo-faciais, queimaduras

severas de pele, úlceras crônicas, osteoartrose, reparo de tendões e ligamentos. O uso clínico não transfusional do PRP é fundamentado em sua habilidade de maximizar o processo de regeneração tecidual ao nível celular. O PRP tem a capacidade de acelerar a vascularização de enxertos, reduzir morbidades pós-cirúrgicas, estimular a regeneração dos tecidos, reduzir a formação de cicatrizes e ainda recrutar e ativar células envolvidas no processo de inflamação/regeneração¹¹.

O PRP pode ser definido como um volume pequeno de plasma, contendo uma alta concentração de plaquetas, obtido através de processos de centrifugação do sangue periférico na presença de substâncias anticoagulantes. Os protocolos de preparo do PRP incluem a coleta de sangue venoso, seguida de uma etapa dupla de centrifugações. Primeiramente, as plaquetas são separadas das outras células sanguíneas, e coletadas junto ao plasma até a interface leucoplaquetária, podendo ou não incluir leucócitos mononucleares. Em uma segunda centrifugação, as plaquetas recuperadas são concentradas em um pequeno volume de plasma, elevando a taxa de plaquetas de 3 a 5 vezes maior do que no sangue periférico^{12,13}. Dohan Ehrenfest et al.^{14,15} ainda classificam esse processamento entre P-PRP (Puro-PRP) ou L-PRP (PRP com Leucócitos) de acordo com a presença ou não dos leucócitos no produto final.

Duas características diferenciam o PRP dos CP produzidos nos centros Hemoterápicos. A primeira é a concentração - já que, por definição, o PRP deve concentrar pelo menos 1×10^6 plaquetas/ μ L em 5 mL de plasma¹², representando de 3x a 5x a concentração basal sanguínea. A segunda é o objetivo de uso: diferente dos concentrados plaquetários hemoterápicos, que se propõem a suplementação de plaquetas já existentes na circulação sanguínea do paciente, a aplicação do PRP objetiva potencializar a regeneração local de tecidos lesionados, que apresentem dificuldades de reparo natural ou falta de aporte sanguíneo direto. Esta regeneração potencializada dá-se graças à excepcional carga de fatores de crescimento e citocinas derivadas da ativação das plaquetas, concentradas no PRP.

Entre os fatores liberados durante a ativação plaquetária, os mais significativos entre os já identificados no PRP são: (a) os da família do Fator de Crescimento Tumoral (TGF- β 1 e 2); (b) o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF); (c) o Fator de Crescimento tipo Insulina (IGF), (d) o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), (e) Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), e (f) o Fator de Crescimento Vaso-Endotelial (VEGF). Este conjunto de fatores (Tabela 1) possui um papel importante na proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia, e angiogênese^{13,16,17}. Além destes fatores presentes nos α -grânulos plaquetários, as plaquetas possuem os grânulos densos, os quais contêm serotonina, histamina, dopamina, além de cálcio e adenosina. Todos estes compostos possuem implicações fundamentais nos aspectos biológicos da cicatrização tecidual¹⁸, modulando o processo de inflamação, estimulando a vascularização e síntese de colágeno, e mediando cicatrização da injúria tecidual^{6,11}.

No PRP, a adição de anticoagulantes impede a ativação precoce das plaquetas e, conseqüentemente, a formação da rede de



Tabela 1. Fatores presentes no PRP.

Fator de crescimento	Efeitos
Fator de crescimento tumoral (TGF-B 1 e 2)	Regula o efeito mitogênico de outros fatores de crescimento; estimula a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; fibroblastos e osteoblasto. Estabilizador vascular e regulador da síntese de colágeno e secreção de collagenase. Estimula angiogênese e quimiotaxia endotelial, inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos.
Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)	Efeito mitogênico para células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos. Estimula o crescimento e diferenciação de cartilagem e osso.
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Estimula a quimiotaxia e a mitose de fibroblastos, células musculares lisas e células da glia. Regula a secreção de collagenase e síntese de colágeno, mitogênico para células mesenquimais e osteoblastos. Estimula a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos.
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Estimula a mitose das células mesenquimais. Regula a secreção de collagenase. Estimula a quimiotaxia e a angiogênese das células endoteliais.
Fator de crescimento vaso-endotelial (VEGF)	Estimula a mitose das células endoteliais. Aumenta a angiogênese e a permeabilidade do vaso.
Fator de crescimento tipo insulina (IGF)	Estimula a diferenciação e mitogênese de células mesenquimais e de células de revestimento. Estimula a proliferação de osteoblastos e a produção de colágeno tipo I, osteocalcina e fosfatase alcalina.

Adaptado de Moshiri e Oryan¹⁹.

fibrina durante a centrifugação¹⁴. Já a ativação das plaquetas no PRP e a liberação dos fatores regenerativos, podem ocorrer de duas formas: (1) durante a manipulação do plasma centrifugado, com a adição de trombina e/ou íons de Ca^{+13,17}, ou (2) diretamente na aplicação no paciente, na qual o trauma causado pela inserção da agulha e/ou o contato com macromoléculas de colágeno tecidual disparam a ativação imediata das plaquetas e a liberação dos fatores regenerativos. A associação do PRP com as matrizes orgânicas e/ou mineralizadas é também possível, gerando por bioengenharia as estruturas em 3D que participarão como suporte para regeneração das estruturas complexas.

Percebe-se que o principal mecanismo de ação do PRP não está nas plaquetas em si, mas no conteúdo de moléculas ativas liberadas pelos seus grânulos plaquetários durante a sua ativação (função secundária das plaquetas). Visto que em nenhum desses protocolos as plaquetas ou os seus produtos serão introduzidos por via vascular e, portanto, a aplicação não será ortóloga, a sua ação pode ser considerada distinta da desempenhada na circulação sanguínea do doador.

Produtos derivados de plaquetas, como o PRP, são utilizados experimentalmente desde os anos 1970, tornando-se bem frequentes a partir dos anos 1990. Mesmo assim, revisões de literatura científica acerca dos “concentrados plaquetários” como o PRP ainda representam uma tarefa difícil, devido à ausência de uma terminologia clara na literatura por vários anos^{13,20}. Muitos CP foram classificados como PRP sem a devida caracterização de concentração dos seus componentes ou do conteúdo, com diferentes protocolos de obtenção. Poucos estudos de fato descreveram quantitativamente e qualitativamente o conteúdo dos PRP. Os concentrados de plaquetas são produtos difíceis de serem caracterizados, pois não são preparações farmacêuticas tradicionais como antibióticos ou anti-inflamatórios. Os concentrados

de plaquetas não representam somente uma associação de vários fatores de crescimento. Eles são associados com os coágulos sanguíneos, que concentram fatores e citocinas que orquestram e modulam a regeneração tecidual²⁰. Também as diferenças biológicas individuais de cada doador, assim como idade e gênero, tornam o PRP variável quanto à composição e dosagem de seus fatores e efeito regenerativo.

Até mesmo o momento da ativação das plaquetas (pré ou pós-aplicação) pode influenciar na liberação de citocinas inflamatórias de vida curta. Outro fator que deve ser levado em conta é o tempo decorrido entre a sua obtenção e a sua aplicação clínica, pois pode comprometer a presença e atuação das citocinas, inicialmente obtidas no PRP²¹.

Aplicações clínicas do PRP

A primeira aplicação clínica registrada do PRP foi no estudo de Ferrari et al.²² em 1987, no qual o PRP foi utilizado como um elemento adicional à transfusão em uma cirurgia de coração. Desde então, a aplicação do PRP tem se mostrado segura e usada principalmente para: ortopedia, medicina esportiva e odontologia, mas também neurocirurgia, oftalmologia, urologia até em cirurgias faciais e estéticas. As evidências suportam que o PRP tem efeitos sobre a inflamação e infecções pós-operatórias, bem como na regeneração de ossos e tecidos conjuntivo, epitelial e muscular²³. Apesar de o uso do PRP se mostrar um método seguro, existem algumas condições em que a aplicação deve ser considerada com cautela: quadros clínicos de trombocitopenia, disfunção das plaquetas, septicemia, hipofibrinogenemia, febre, anemia, câncer, lesões dérmicas na área de aplicação, uso de corticoides e anti-inflamatórios além de infecções ativas^{11,24}.



Importante é ressaltar que a falta de padronização de protocolos bem estabelecidos para o PRP gera muitos resultados controversos. Estudos com resultados insatisfatórios são muitas vezes associados à baixa qualidade do material obtido, tanto quanto a concentração das plaquetas, quanto na sua integridade e efetividade da ativação¹¹.

O método de obtenção do PRP foi elaborado e padronizado ainda na década de 1970^{18,25} e as aplicações clínicas de PRP ocorreram

em cirurgias buco-maxilo-faciais, na década de 1990²⁶. Em 2003, surgiu o primeiro relato do uso humano do PRP em ortopedia, na avulsão não traumática da cartilagem articular do joelho, na forma de relato de caso²⁷. Desde então, diversos artigos científicos foram publicados com uso de PRP também na engenharia tecidual óssea, no tratamento de lesões na cartilagem articular, lesões musculares e tendíneas, onde se concentram a maioria dos estudos com PRP²⁸. A Tabela 2 apresenta alguns dos resultados mais recentes descritos na literatura científica do uso do PRP para doenças ortopédicas.

Tabela 2. Estudos clínicos e aplicações do PRP em ortopedia.

Autores	Tipo de Lesão	Tipo de estudo	Número de pacientes (ou sítio cirúrgico)	Grupos experimentais	Principais Resultados Clínicos
Campell et al., 2015 ²⁹	Osteoartrose de Joelho	Revisão sistemática	3.278 joelhos	PRP e controle (ácido hialurônico ou placebo)	Houve diferença significativa na melhora clínica dos pacientes tratados com PRP - 2 e 12 meses após o tratamento, porém não foi possível definir número de aplicações ideal.
Meheux et al., 2016 ³⁰	Osteoartrose de Joelho	Revisão sistemática (6 estudos)	817 joelhos	PRP e controle (ácido hialurônico)	Houve diferença significativa na melhora clínica dos pacientes tratados com PRP - 3 e 12 meses após tratamento (avaliado pelo índice Womac).
Kanchanatawan et al., 2016 ³¹	Osteoartrose de Joelho	Revisão sistemática (551 estudos avaliados)	-	PRP, ácido hialurônico (AH) e placebo)	Em resultados de curto prazo (≤ 1 ano), a injeção de PRP melhorou os resultados funcionais (avaliado pelos índices Womac, IKDC e EQ-VAS) quando comparado com ao AH e placebo, mas não houve diferença estatisticamente significante em eventos adversos quando comparado com AH e placebo. Este estudo sugere que a injeção de PRP é mais eficaz do que o AH e placebo na redução dos sintomas e melhorar a função e qualidade de vida. O estudo sugere que o tratamento com PRP possui o potencial para pacientes com osteoartrose leve a moderada do joelho que não responderam ao tratamento convencional.
Dai et al., 2017 ³²	Osteoartrose de Joelho	Revisão sistemática (10 estudos)	1.069 pacientes	PRP e controle (ácido hialurônico)	Não houve diferença significativa na melhora clínica (dor e função articular) dos pacientes tratados com PRP ou ácido hialurônico aos 6 meses após tratamento (avaliado pelo índice Womac). Porém, aos 12 meses houve diferença significativa na melhora clínica (tanto na dor quanto função articular) dos pacientes tratados com PRP em relação ao ácido hialurônico (avaliado pelo índice Womac). PRP não aumenta riscos de eventos adversos.
Kuang et al., 2016 ³³	Artroplastia total de joelho	Revisão sistemática (12 estudos)	1.234 pacientes (1.333 joelhos)	Gel de plaquetas autólogo e controle (placebo)	O tratamento com gel de plaquetas autólogo melhora controle de dor (avaliado pela escala VAS), porém não há diferença entre perda sanguínea, tempo de internação, e recuperação no pós-operatório.

Continua



Tabela 2. Estudos clínicos e aplicações do PRP em ortopedia. Continuação

Li et al., 2017 ³⁴	Artroplastia total de joelho	Revisão sistemática	1.316 pacientes	PRP e controle (placebo)	O tratamento com PRP aumenta significativamente a função motora (avaliado pelo índice ROM) em 30 dias e 3 meses pós-cirurgia. Não há diferença significativa na melhora clínica (avaliada pelo índice Womac) entre os dois grupos experimentais nos tempos 24 horas, 48 horas, e 7 dias pós-cirurgia. Não há diferença significativa entre dois grupos na ocorrência de infecção.
Warth et al., 2015 ³⁵	Ruptura do manguito rotador	Revisão sistemática (11 estudos)	-	PRP e controle	Não houve diferença significativa na melhora clínica (avaliado pelo índice ASES, Constant, VAS) dos pacientes tratados com PRP ou controles. Porém, há um aumento significativo na escala Constant quando PRP é colocado na interface tendão-osso e não quando é colocado diretamente na superfície de lesão.
Di Matteo et al., 2016 ³⁶	Ligamento cruzado anterior	Revisão sistemática (23 estudos clínicos)	-	PRP, PRP com células-tronco e controle	Há evidências de que o PRP melhora a maturação do implante e sua integração óssea.
Everhart et al., 2017 ³⁷	Tendinopatia patelar	Revisão sistemática (15 estudos clínicos)	-	PRP e controles	O tratamento com PRP acelera a recuperação dos pacientes.
Chiew et al., 2016 ³⁸	Fascite Plantar	Revisão sistemática (1.126 artigos científicos)	455 pacientes	PRP e controle (esteroides)	O tratamento com PRP foi superior ao tratamento com esteroides e não provoca nenhum tipo de reação adversa ou complicações clínicas.
Filardo et al., 2016 ³⁹	Lesões tendíneas	Revisão sistemática de estudos clínicos de nível I, II, III e IV	19 artigos científicos sobre tendão patelar, 24 sobre tendão de Aquiles, 29 sobre tendão lateral do ombro, 32 sobre manguito rotador	PRP e controle	O PRP demonstrou ser benéfico para o tratamento do tendão patelar, mas não o tendão de Aquiles. Para o tratamento de tendinopatia lateral do ombro foi observada uma melhora clínica na maioria dos estudos de fases mais avançadas, mas faltaram evidências da superioridade em tratamentos convencionais. Nas patologias do manguito rotador, a maioria dos estudos declarou faltar provas dos efeitos benéficos do PRP em relação às terapias tradicionais.
Roffi et al., 2017 ⁴⁰	Defeitos ósseos (fraturas pseudoartrose)	Revisão sistemática (45 artigos científicos pré-clínicos e 19 clínicos)	-	PRP e controles	Nos estudos pré-clínicos os benefícios do PRP são observados em 91,1% dos estudos, em análises histológicas os resultados positivos aparecem em 84,4% dos estudos e os resultados biomecânicos e radiológicos são observados em 72,5% e 75% dos estudos, respectivamente. Os resultados dos ensaios clínicos ainda são inconclusivos.
Pas et al., 2015 ⁴¹	Lesão isquiotibiais	Revisão sistemática	526 pacientes	PRP e controle	A meta-análise mostrou eficácia superior para exercícios de reabilitação. A injeção de PRP não teve efeito sobre a lesão aguda do isquiotibiais. Foram encontradas provas limitadas de que a agilidade e a estabilização do tronco podem reduzir as taxas de re-lesão. As limitações identificadas na maioria dos ECAs devem melhorar a concepção de novos ECAs isquiotibiais.

ASES: American Shoulder and Elbow Surgeons; Constant: Constant Score; DASH: Disability of the Arm, Shoulder and hand; KJOC: Kerlan Jobe Orthopaedic Clinic; PRP: plasma rico em plaquetas; ROM: Range of Motion; VAS: visual analogic scale; Womac: The Western Ontario McMaster Universities Osteoarthritis Index Bellamy.



Embora os principais estudos clínicos com o PRP concentrem-se na área das doenças ortopédicas¹⁸, muitos outros vêm explorando o potencial regenerativo do PRP para outras áreas. Em procedimentos dermatológicos e estéticos, o PRP vem sendo utilizado na forma de injeções tópicas faciais para o preenchimento e regeneração de rugas faciais (efeitos anti-idade)⁴², cicatrizes por acne, ou áreas deprimidas ou foto-danificadas. Aplicações de PRP têm sido realizadas, com resultados positivos, em conjunção com procedimentos de *lifting* facial, enxertos de tecido adiposo⁴³, laser fracionado e alopecia^{42,44,45}. Ainda outros estudos também avaliaram o potencial do PRP em úlceras crônicas^{23,42} e lesões musculares^{46,47} até mesmo em lesões oculares⁴⁸.

Aspectos regulatórios do uso do PRP para fins terapêuticos não transfusionais

Legislações no Brasil

O preparo do PRP para uso clínico segue os regulamentos definidos pela Anvisa na Nota Técnica nº 64, de 14 de julho de 2015 como segue:

O processamento do PRP com finalidade autóloga, por meio de sistema fechado, poderá ser realizado em estabelecimentos assistenciais de saúde, de acordo com o disposto na RDC nº 63/2011, que dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de funcionamento para os Serviços de Saúde, ou a que vier a substituí-la⁴⁹.

Especifica-se ainda que:

os produtos utilizados para o processamento do PRP devem ser regularizados pela Anvisa, conforme RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento de produtos médicos e devem ser utilizados de acordo com as instruções/recomendações dos fabricantes⁵⁰.

Já o preparo em sistema aberto recebe a seguinte definição:

O processamento do PRP por meio de sistema aberto deverá ser realizado em Centros de Processamento Celular, de acordo com o disposto pela recém publicada RDC nº 214, de 7 de fevereiro de 2018⁵¹, dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, ou a que vier a substituí-la.

A RDC nº 214/2018 foi elaborada com base na consulta pública nº 270/2016, que definiu os procedimentos a serem usados na produção do PRP⁵².

O uso não-transfusional do PRP segue a Nota Técnica Nº. 064/2015 GSTCO/GGPBS/Sumed/Anvisa⁴⁹ sobre a “Utilização de Plasma Rico em Plaquetas - PRP para fins terapêuticos não transfusionais” que especifica: “As indicações clínicas e finalidade terapêutica para o uso de PRP deverão ser reconhecidas e regulamentadas pelos respectivos Conselhos Profissionais”.

Na Resolução no 2.128, de 17 de julho de 2015, o Conselho Federal de Medicina (CFM) considera a prática do uso do PRP como

experimental no tratamento de doenças musculoesqueléticas e outras⁵³. A mesma resolução ainda restringe o uso do PRP à experimentação clínica, dentro dos protocolos do sistema Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep). A Resolução CFM nº 1.499 de 1998⁵⁴ proíbe aos médicos a prestação de serviços de práticas terapêuticas não reconhecidas pela comunidade científica. Portanto, as pesquisas clínicas utilizando PRP deverão ser realizadas, sendo previamente aprovadas pelo sistema CEP/Conep.

Por outro lado, o Conselho Regional de Odontologia, por meio da Resolução CFO nº 158/2015 regulamenta o uso do Plasma Rico em Plaquetas e da Fibrina Rica em Plaquetas, denominados como Agregados Plaquetários Autólogos, para fins não transfusionais no âmbito da Odontologia⁵⁵. Considera-se o PRP como a porção do sangue que contém os componentes plaquetários, com a adição de qualquer produto, inclusive anticoagulante ou coagulante.

Seguindo a consulta pública da Anvisa nº 270/2016, os produtos biológicos constituídos por células humanas ou seus derivados, não quimicamente definidos, autólogos ou alogênicos, que desempenham no receptor a função distinta da desempenhada no doador, serão considerados como produtos de terapias celulares avançadas, cujo uso terá seus próprios regulamentos⁵². Essa definição se aplica ao uso do PRP em procedimentos não-transfusionais, os quais deverão ser então adequados à nova legislação.

Exemplos de legislações internacionais

O PRP é classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA), agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, como um material autólogo e minimamente manipulado, obtido a partir do sangue, usado essencialmente por via local ou tópica^{56,57}. Os dispositivos utilizados no preparo do PRP são sujeitos à liberação da FDA, sendo considerados de baixo risco. Devem ser, pelo menos, tão seguros e eficazes quanto um dispositivo já legalmente comercializado⁵⁶. O PRP pode ser parte de um conjunto de procedimentos, como associado a materiais de enxerto ósseo.

Atualmente, o uso do PRP nos Estados Unidos é considerado um procedimento médico, não sujeito à regulação do FDA. O FDA não regula a prática da medicina, sendo assim, os clínicos podem usar produtos em “uso não descrito” - *off label*⁵⁸, desde que tenham a responsabilidade de estarem bem informados sobre o produto, basear o seu uso no racional científico e em evidência médica, além de manterem registros do uso do produto e seus efeitos^{56,59}.

Na Europa, o quadro regulatório relativo ao sistema sanguíneo é atualmente regido pela *Directive 2002/98/EC of the European Parliament and Council*, de 27 de janeiro 2003, a qual estabelece regras quanto à qualidade e segurança para coletar, controlar, processar, preservar e distribuir sangue humano e seus componentes, reconhecidas as regulações internas nos vários estados da União⁶⁰. Os componentes do sangue podem ser considerados produtos ou medicamentos. Dependendo da quantidade, do processamento e do protocolo clínico, eles podem ser utilizados de uma maneira menos restritiva, sob a prescrição e controle de um médico⁶¹.



Na Itália, são classificados como de “aplicação tópica” os procedimentos em que componentes do sangue não são aplicados aos pacientes por transfusão, mas sim diretamente na área afetada, como por injeção intra-articular ou intra-tecidual em ortopedia, ou cutânea e subcutânea em dermatologia e cirurgia plástica. A manipulação de sangue é restrita aos Serviços de Transfusão de Sangue, mas o preparo do PRP pode acontecer em nível ambulatorial⁶¹.

A Agência Espanhola de Medicamentos e Dispositivos Médicos (AEMPS) elaborou um relatório abrangente e uma resolução que regula o uso do PRP como produto médico para uso humano, definindo a composição do PRP, seus mecanismos de ação e guias médicos para o uso⁶². Os produtos médicos incluem qualquer substância ou combinação de substâncias que podem ser utilizadas ou administradas aos seres humanos, com a função de restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou ação metabólica ou fazendo um diagnóstico médico⁵⁹. O uso do PRP pode ser prescrito por um médico ou dentista. Deve ser manipulado com equipamentos e instrumentos apropriados, em centros de saúde autorizados, de acordo com as regulações regionais.

Os equipamentos precisarão ser registrados na CE medical-device, indicando que cumprem as diretivas europeias e deveriam ser usados de acordo com as instruções do fabricante. Em termos de eficácia, o uso do PRP pode ser classificado em três categorias, dependendo da evidência disponível: (a) patologias nas quais há evidência para recomendar o tratamento, (b) aquelas em que houve um balanço negativo entre risco e benefício e não serão recomendadas para uso e (c) aquelas que requerem maiores evidências. Os médicos terão de adotar medidas específicas de controle, supervisão e rastreabilidade para prevenir a transmissão de doenças infecciosas. Eles deverão notificar imediatamente a autoridade de fármaco-vigilância qualquer suspeita de reação adversa.

Todos os medicamentos devem ter um resumo no qual as características do produto são detalhadas e um folheto informativo com informações básicas e instruções para o paciente. Deve-se expor os prós e contras comparados com outros tratamentos e qualquer potencial riscos e/ou efeitos colaterais.

Até o momento, não há um protocolo padrão-ouro e claro para a fabricação de PRP, assim como ainda há pouca caracterização realizada nos produtos obtidos e falta de regulação e padronização. Para caracterizar os componentes principais que desempenham papel-chave na regeneração tecidual e formular uma preparação adequada para cada situação fisiopatológica, um procedimento simples e bem definido é necessário, onde as condições de centrifugação são fundamentais para se obter um PRP com alta qualidade⁶³.

CONCLUSÕES

O PRP usado em procedimentos não transfusionais representa um produto quimicamente não definido, e tem sido utilizado de modo não ortólogo, nas áreas de ortopedia, dermatologia, odontologia, oftalmologia. De acordo com as novas propostas da Anvisa, será considerado, portanto, uma Terapia Celular Avançada. Assim como nos Estados Unidos e na Europa, independentemente do PRP ser preparado em sistemas abertos ou fechados, será necessário melhor definir a sua composição e a sua capacidade de ação terapêutica. Esses parâmetros deverão ter as suas especificações mínimas definidas, de acordo com as suas indicações de uso. Essas também precisam ser descritas, em cada área, de acordo com o grau de evidência científica, que corrobore a sua utilização. Além disso, faz-se necessário estabelecer critérios de controle de qualidade, como rastreabilidade, eficácia e fármaco-vigilância, para que seja devidamente controlado pelos órgãos regulatórios responsáveis, permitindo maior segurança no seu uso.

REFERÊNCIAS

1. Castro HC, Ferreira BL, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(5):321-32. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000500004>
2. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol.* 2006;134(5):453-66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06215.x>
3. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3348-54. <https://doi.org/10.1172/JCI26891>
4. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015;29(3):153-62. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>
5. Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LM, Carvalho MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(5):416-21. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016>
6. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials.* 2016;76:371-87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.065>
7. Ministério da Saúde (BR). Guia para o uso de Hemocomponentes. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.
8. Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio-Libanês. Guia de condutas hemoterápicas. 2a ed. São Paulo: Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio-Libanês; 2010. Transfusão de plaquetas, p. 35-42.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 57, de 16 de dezembro de 2010. Determina o regulamento sanitário para serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. *Diário Oficial União.* 17 dez. 2010.



10. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 1.353, de 13 de junho de 2011. Aprova o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial União. 14 jun 2011.
11. Marques LF, Stessuk T, Camargo IC, Sabeh Junior N, Santos L, Ribeiro-Paes JT. Platelet-rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications. *Platelets*. 2015;26(2):101-13. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.881991>
12. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8. <https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002>
13. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):67. <https://doi.org/10.1186/scrt218>
14. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
15. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(1):3-9. <https://doi.org/10.11138/mltj/2014.4.1.0013>
16. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e56-60. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011>
17. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(4):308-16. <https://doi.org/10.2106/JBJS.K.00430>
18. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009;37(11):2259-72. <https://doi.org/10.1177/0363546509349921>
19. Moshiri A, Oryan A. Role of platelet-rich plasma in soft and hard connective tissue healing : an evidence-based review from basic to clinical application. *Hard Tissue*. 2013;2(1):1-19. <https://doi.org/10.13172/2050-2303-2-1-326>
20. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1231-56. <https://doi.org/10.2174/138920112800624472>
21. Hauschild G, Geburek F, Gosheger G, Eveslage M, Serrano D, Streitbürger A et al. Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):7. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0920-4>
22. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. 1987;10(1):47-50.
23. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008;1(3-4):165-74. <https://doi.org/10.1007/s12178-008-9032-5>
24. Tate KS, Crane DM. Platelet rich plasma grafts in musculoskeletal medicine. *J. Prolotherapy*. 2016;2(2):371-6.
25. Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, Redl H, Griensven M. State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(4):e36-51. <https://doi.org/10.1002/term.386>
26. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(6):638-46. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4)
27. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(10):1648-52. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000089344.44434.50>
28. Mlynarek RA, Kuhn AW, Bedi A. Platelet-Rich Plasma (PRP) in orthopedic sports medicine. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 45(5):290-326.
29. Campbell KA, Saltzman BM, Mascarenhas R, Khair MM, Verma NN, Bach BR Jr et al. Does Intra-articular platelet-rich plasma injection provide clinically superior outcomes compared with other therapies in the treatment of knee osteoarthritis? A systematic review of overlapping meta-analyses. *Arthroscopy*. 2015;31(11):2213-21. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.03.041>
30. Meheux CJ, McCulloch PC, Lintner DM, Varner KE, Harris JD. Efficacy of Intra-articular platelet-rich plasma injections in knee osteoarthritis: a systematic review. *Arthroscopy*. 2016;32(3):495-505. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.08.005>
31. Kanchanatawan W, Arirachakaran A, Chaijenkij K, Prasathaporn N, Boonard M, Piyapittayanun P et al. Short-term outcomes of platelet-rich plasma injection for treatment of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016;24(5):1665-77. <https://doi.org/10.1007/s00167-015-3784-4>
32. Dai WL, Zhou AG, Zhang H, Zhang J. Efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthroscopy*. 2017;33(3):659-670.e1. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2016.09.024>
33. Kuang M-J, Han C, Ma J-X, Li F, Zhao J, Fu L et al. The efficacy of intraoperative autologous platelet gel in total knee arthroplasty: a meta-analysis. *Int J Surg*. 2016;36(Pt A):56-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2016.10.021>



34. Li FX, Li Y, Qiao CW, Zhu J, Chen J, Zhang PY. Topical use of platelet-rich plasma can improve the clinical outcomes after total knee arthroplasty: A systematic review and meta-analysis of 1316 patients. *Int J Surg*. 2017;38:109-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijvs.2016.12.013>
35. Warth RJ, Dornan GJ, James EW, Horan MP, Millett PJ. Clinical and structural outcomes after arthroscopic repair of full-thickness rotator cuff tears with and without platelet-rich product supplementation: a meta-analysis and meta-regression. *Arthroscopy*. 2015;31(2):306-20. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2014.09.007>
36. Di Matteo B, Loibl M, Andriolo L, Filardo G, Zellner J, Koch M et al. Biologic agents for anterior cruciate ligament healing: a systematic review. *World J Orthop*. 2016;7(9):592-603. <https://doi.org/10.5312/wjo.v7.i9.592>
37. Everhart JS, Cole D, Sojka JH, Higgins JD, Magnussen RA, Schmitt LC et al. Treatment options for patellar tendinopathy: a systematic review. *Arthroscopy*. 2017;44(4):861-72. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2016.11.007>
38. Chiew SK, Ramasamy TS, Amini F. Effectiveness and relevant factors of platelet-rich plasma treatment in managing plantar fasciitis: a systematic review. *J Res Med Sci*. 2016;21(3):38. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.183988>
39. Filardo G, Di Matteo Bi, Kon E, Merli G, Marcacci M. Platelet-rich plasma in tendon-related disorders: results and indications. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016;1-16. <https://doi.org/10.1007/s00167-016-4261-4>
40. Roffi A, Krishnakumar GS, Gostynska N, Kon E, Candrian C, Filardo G. The role of three-dimensional scaffolds in treating long bone defects: evidence from preclinical and clinical literature: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8074178. <https://doi.org/10.1155/2017/8074178>
41. Pas HI, Reurink G, Tol JL, Weir A, Winters M, Moen MH. Efficacy of rehabilitation (lengthening) exercises, platelet-rich plasma injections, and other conservative interventions in acute hamstring injuries: an updated systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2015;49(18):1197-205. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2015-094879>
42. Conde Montero E, Fernández Santos ME, Suárez Fernández R. Platelet-rich plasma: applications in dermatology. *Actas Dermosifiliogr*. 2015;106(2):104-11. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2014.12.009>
43. Luck J, Smith OJ, Mosahebi A. A systematic review of autologous platelet-rich plasma and fat graft preparation methods. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2017;5(12):e1596. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001596>
44. Frautschi RS, Hashem AM, Halasa B, Cakmakoglu C, Zins JE. Current evidence for clinical efficacy of platelet rich plasma in aesthetic surgery: a systematic review. *Aesthet Surg J*. 2017;37(3):353-62. <https://doi.org/10.1093/asj/sjw178>
45. Picard F, Hersant B, Niddam J, Meningaud JP. Injections of platelet-rich plasma for androgenic alopecia: A systematic review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2017;118(5):291-7. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2017.06.011>
46. De Carli A, Volpi P, Pelosini I, Ferretti A, Melegati G, Mossa L et al. New therapeutic approaches for management of sport-induced muscle strains. *Adv Ther*. 2009;26(12):1072-83. <https://doi.org/10.1007/s12325-009-0086-6>
47. Hamilton BH, Best TM. Platelet-enriched plasma and muscle strain injuries: challenges imposed by the burden of proof. *Clin J Sport Med*. 2011;21(1):31-6. <https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e318205a658>
48. Riestra AC, Alonso-Herreros JM, Merayo-Llodes J. Platelet rich plasma in ocular surface. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2016;91(10):475-90. <https://doi.org/10.1016/j.oftal.2016.03.00149>
49. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Nota Técnica N° 64, de 14 de julho de 2015[acesso 15 jan 2018]. Utilização de Plasma Rico em Plaquetas - PRP para fins terapêuticos não transfusionais. *Diário Oficial União*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/330709/Nota+T%C3%A9cnica+n%C2%BA+64+de+2015/2fdb26c4-e470-43fa-9241-3db5650a8835>
50. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução N° 185, de 22 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial União*. 6 nov 2011.
51. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 214, de 7 de fevereiro de 2018. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 22 fev 2018.
52. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Consulta Pública N° 270, de 4 de novembro de 2016. Proposta de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) que dispõe sobre as Boas Práticas em Células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica. *Diário Oficial União*. 8 nov 2016.
53. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM N° 2.128/2015. Considerar o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) como procedimento experimental, só podendo ser utilizado em experimentação clínica dentro dos protocolos do sistema CEP/CONEP. *Diário Oficial União*. 29 out 2015.
54. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM N° 1.499/1998. Proíbe a utilização de práticas terapêuticas não reconhecidas pela comunidade científica. *Diário Oficial União*. 3 set 1998.
55. Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO N° 158, de 8 de junho de 2015. Regulamenta o uso de Agregados Plaquetários Autólogos para fins não transfusionais no âmbito da Odontologia. *Diário Oficial União*. 6 jul 2015.
56. Beitzel K, Allen D, Apostolakis J, Russell RP, McCarthy MB, Gallo GJ et al. US definitions, current use, and FDA stance on use of platelet-rich plasma in sports medicine. *J Knee Surg*. 2015;28(1):29-34. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1390030>
57. Chahla J, Cinque ME, Piuze NS, Mannava S, Geeslin AG, Murray IR et al. A call for standardization in platelet-rich plasma preparation protocols and composition reporting: a systematic review of the clinical orthopaedic literature. *J Bone Joint Surg Am*. 2017;99(20):1769-79. <https://doi.org/10.2106/JBJS.16.01374>



58. U.S. Food and Drugs Administration. "Off-Label" and investigational use of marketed drugs, biologics, and medical devices: information sheet. Silver Spring: U.S. Food and Drugs Administration; 2016.
59. Anitua E, Prado R, Orive G. Closing regulatory gaps: new ground rules for platelet-rich plasma. *Trends Biotechnol.* 2015;33(9):492-5. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.00260>
60. The European Parliament and the Council of The European Union. Directive 2002/98/EC, of 27 January 2003. Setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending. 2003[acesso 24 jan 2018]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2002_98/dir_2002_98_en.pdf
61. Fiorentino S, Roffi A, Filardo G, Marcacci M, Kon E. European definitions, current use, and EMA stance of platelet-rich plasma in sports medicine. *J Knee Surg.* 2015;28(1):51-4. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1396016>
62. Spanish Agency of Medicines and Medical Devices. Resolution establishing the classification of non-replacement therapeutic use of autologous plasma and its fractions, components or derivatives as a medicinal product for human use to meet specialised needs. 2013[acesso 24 jan 2018]. Disponível em: <http://www.aemps.gob.es/legislacion/espana/medicamentosUsoHumano/docs/medEspeciales/resolucion-PRP.pdf>
63. Chicharro-Alcántara D, Rubio-Zaragoza M, Damiá-Giménez E, Carrillo-Poveda JM, Cuervo-Serrato B, Peláez-Gorrea P et al. Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management. *J Funct Biomater.* 2018;9(1):10. <https://doi.org/10.3390/jfb9010010>

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.

Métodos alternativos para a detecção de pirogênios em produtos e ambientes sujeitos a Vigilância Sanitária: avanços e perspectivas no Brasil a partir do reconhecimento internacional do Teste de Ativação de Monócitos

Alternative methods for the detection of pyrogens in products and environment subject to public health surveillance: advances and perspectives in Brazil based on the international recognition of the Monocyte Activation Test

Cristiane Caldeira da Silva^{I,II,*}
Carolina Barbara Nogueira de Oliveira^I
Patrícia dos Santos Carneiro^{III}
Eliana Blini Marengo^{II}
Katherine Antunes de Mattos^{IV}
Ricardo Sergio Couto de Almeida^V
Janaína Spoladore^{VI}
Gutemberg Gomes Alves^{VI}
Octavio Augusto França Presgrave^{II}
Isabella Fernandes Delgado^{VII}

^I Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Laboratório de Desenvolvimento Analítico e Estabilidade, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

^{IV} Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^V Universidade Estadual de Londrina, Paraná, PR, Brasil

^{VI} Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{VII} Vice Presidência de Educação, Informação e Comunicação, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br

Recebido: 31 out 2017

Aprovado: 08 jan 2018

RESUMO

Introdução: A detecção de pirogênios é imprescindível no controle da qualidade de produtos injetáveis. O Teste de Pirogênio em coelhos ainda tem larga aplicação, apesar da existência de métodos alternativos como o Teste de Ativação de Monócitos (MAT). **Objetivo:** Revisar o uso dos métodos alternativos no teste de pirogênio, apontando avanços e perspectivas a partir do reconhecimento do MAT pela Farmacopeia Europeia e sua aceitação para fins regulatórios no Brasil. **Método:** Uma busca foi realizada nas bases PubMed e BVS, com posterior classificação, categorização por assuntos e análise crítica dos resultados. **Resultados:** Foram identificados 24 trabalhos, abordando temas como as aplicações do MAT, sua validação e comparação com testes *in vivo*. O MAT apresentou melhores resultados quando comparado a outros testes, tanto na avaliação de produtos biológicos como na detecção de pirogênios não-endotoxinas. Limitações para sua difusão incluem a dificuldade de obtenção de sangue total humano como fonte de monócitos, para o qual diversas alternativas têm sido propostas. **Conclusões:** O MAT se mostra um método promissor, com aplicação na avaliação da segurança de novas tecnologias. Sua aplicação no Brasil depende de uma política nacional de implantação, que inclua maior Integração entre BraCVAM, Concea e RENAMA na busca por seu reconhecimento para fins regulatórios.

PALAVRAS-CHAVE: Métodos Alternativos; Pirogênio; Teste de Ativação de Monócitos; Técnicas *in vitro*; Controle da Qualidade; Legislação

ABSTRACT

Introduction: The detection of pyrogens is essential for the quality control of injectable products. The Rabbit Pyrogen Test remains widely used, despite the existence of alternative methods such as the Monocyte Activation Test (MAT). **Objective:** To review the use of alternative methods for pyrogen testing, pointing out advances and perspectives from the recognition of MAT by the European pharmacopoeia and its acceptance for regulatory purposes in Brazil. **Method:** A search was performed on the PubMed and BVS databases, with further classification, categorization by topic and critical analysis of the results. **Results:** Twenty-four papers were identified, addressing topics such as applications of MAT, its validation and comparisons with *in vivo* tests. MAT presented better results when compared to other tests, both in the evaluation of biological products and in the detection of non-endotoxin pyrogens. Limitations to diffusion include difficulties in obtaining whole human blood as a source of monocytes, for which several alternatives have been proposed. **Conclusions:** MAT is a promising method, with application in safety evaluation of new technologies. Its application in Brazil depends on a national implementation policy, which might include greater integration between BraCVAM, Concea and RENAMA in search for its recognition for regulatory purposes.

KEYWORDS: Alternative Methods; Pyrogen; Monocyte Activation Test; *In vitro* Techniques, Quality Control; Legislation



INTRODUÇÃO

Todos os produtos injetáveis que se encontram no mercado devem ser livres de pirogênio, uma vez que este tipo de contaminação pode ser considerado um grave problema de saúde pública podendo causar desde alterações vasculares até um quadro de choque e morte. Portanto, os testes para a detecção de pirogênio são ensaios de segurança toxicológicos imprescindíveis tanto nas etapas de produção quanto no controle da qualidade de produtos injetáveis, garantindo a segurança do uso desses produtos e evitando efeitos adversos à saúde^{1,2,3}. Existem três testes farmacopeicos: (i) o Teste de Pirogênio em coelhos, (ii) o Teste de Endotoxina Bacteriana ou Lisado de Amébocito do *Limulus* (LAL) e (iii) o Teste de Ativação de Monócitos (MAT)⁴. A Farmacopeia Brasileira, assim como a Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopoeia* - USP) só possuem monografia para o Teste de Pirogênio *in vivo* e o LAL, sendo que a Farmacopeia Europeia reconheceu o MAT, em 2010, como um terceiro teste^{5,6,7}. Recentemente, após uma revisão técnica da Farmacopeia Europeia, o MAT passou a ser reconhecido como método substitutivo do teste de pirogênio *in vivo* para endotoxinas após validação específica para produto sob análise⁸.

O Teste de Pirogênio *in vivo* foi primeiramente descrito por Hort e Penfold⁹ em 1911 e foi introduzido na USP como método oficial em 1942. Este teste fundamenta-se na observação da resposta febril em coelhos, após injeção intravenosa da solução em análise, baseado na dose-resposta similar entre o homem e coelho, onde 1 ng/kg (5 UE/kg) é a dose mínima que causa febre. O Teste de Pirogênio *in vivo*, apesar de ser um ensaio seguro por detectar um amplo espectro de produtos, inclusive os biológicos, não pode ser utilizado para algumas classes de medicamentos, como analgésicos, antitérmicos e anti-inflamatórios. Fatores relacionados ao animal como diferenças de resposta entre raças, sexo e a variabilidade biológica também contribuem para possíveis resultados falso-positivos e falso-negativos¹.

A partir de 1959, com a publicação do livro *The principles of humane experimental technique*¹⁰, foi introduzido no meio científico o conceito dos 3Rs (do inglês, *Reduction, Refinement & Replacement*) e desde então, um grande esforço vem sendo realizado na busca por métodos alternativos ao Teste de Pirogênio em coelhos. Em 1964, Levin e Bang¹¹ descreveram a reação de coagulação da hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) após contato com a endotoxina, sendo que o que o LAL ou teste de endotoxina ou teste de Endotoxina só foi reconhecido na Farmacopeia dos Estados Unidos em 1980¹², pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 1987, e na Farmacopeia Brasileira em 1996¹³. O Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Concea), Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016, art. 2º, reconheceu o LAL como um teste para avaliar a contaminação pirogênica em produtos injetáveis¹⁴. O LAL é considerado um método rápido, fácil e sensível para a detecção de endotoxinas, entretanto, a adoção do LAL como substituto do Teste de Pirogênio *in vivo* não torna possível a detecção de bactérias Gram-positivas e fungos, que compreendem a maioria dos formadores de esporos, e representam um

diferencial na contaminação pirogênica. Portanto, o uso unicamente do LAL negligenciaria possíveis contaminações, causando riscos à saúde da população^{4,15,16,17,18,19}. Além disso, pelo fato do LAL detectar somente endotoxina livre, seu uso é restrito para parte dos produtos biológicos devido à sua ligação a proteínas plasmáticas, o que pode gerar resultados falso-negativos^{18,19}.

Foi somente no final da década de 1980 que um novo método para a detecção de pirogênios com potencial para substituir o teste em coelhos foi descrito. A primeira demonstração da aplicação do teste de liberação de citocinas *in vitro* foi através do “teste do monócito”, em comparação com os ensaios em coelho e o LAL. Nesse método, uma linhagem celular monocítica humana denominada Monomac-6 (MM6) foi submetida à presença de endotoxinas de diversas origens e algumas citocinas como a Interleucina 1 Beta (IL-1B) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) foram dosadas demonstrando uma boa relação dose-resposta²⁰. Durante a década de 1990, vários estudos sobre a detecção *in vitro* de pirogênios foram publicados^{21,22,23,24}. Em 2001, Hartung et al.¹⁶ publicaram no relatório final de um *workshop* patrocinado pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (EURL ECVAM), a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos para enfrentar as limitações do Teste Pirogênio *in vivo*, destacando a necessidade de novas abordagens. O processo de validação internacional do teste de liberação de citocinas foi publicado em 2005, inicialmente para nove medicamentos, utilizando sangue total humano fresco¹⁷ e criopreservado^{25,26}. A partir desta publicação, o EURL ECVAM apresentou ao Comitê Organizador Interagências para Validação de Métodos Alternativos o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), a avaliação do *status* de validação de cinco métodos alternativos *in vitro* baseados na liberação de citocinas pró-inflamatórias^{18,27}. Os métodos avaliados foram: (i) Sangue total humano (WB, sigla do inglês *Whole Blood*)/Interleucina (IL)-1B; (ii) Sangue total humano WB/IL-1B: com aplicação do sangue criopreservado, (iii) Sangue total humano WB/IL-6, (iv) Células Mononucleares do sangue periférico (PBMC, sigla do inglês *peripheral blood mononuclear cells*)/IL-6 e (v) teste com a linhagem celular Monomac-6 (MM6)/IL-6. Entretanto, naquele momento, o ICCVAM considerou insuficiente o estudo de validação internacional, apontando três limitações principais: i) os dados não incluíram produtos biológicos ou dispositivos médicos, além de terem sido avaliados apenas para um número restrito de produtos farmacêuticos, ii) os dados *in vivo* não foram gerados com as mesmas amostras utilizadas no teste *in vitro*, já que foram coletados de banco de dados anteriores ao estudo, e iii) a necessidade de novos estudos comparando os dados *in vivo* com dados *in vitro*, de forma que comparações pudessem ser realizadas para endotoxina e outros agentes pirogênicos, assim ampliando o número de produtos avaliados. Desta forma, o ICCVAM recomendou que, embora nenhuma das cinco variantes do MAT pudesse ser considerada como um substituto completo para o teste *in vivo*, esse método alternativo poderia ser utilizado para detectar endotoxinas^{18,27}.



Em 2010, o MAT foi reconhecido pela Farmacopeia Europeia dentro destas recomendações⁷.

No Brasil, a primeira lei voltada exclusivamente para a regulamentação e a utilização de animais na experimentação e ensino foi a Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008²⁸, também conhecida como Lei Arouca, que criou o Concea. Este marco facilitou a formação do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos ou BraCVAM (do inglês, *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*) em 2012 (Diário Oficial da União de 18 de janeiro de 2012)²⁹ e a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) Portaria nº 491, de 03 de julho de 2012, que instituiu a RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC)³⁰. No entanto, mesmo com a criação de uma legislação e de órgãos fortemente direcionados ao conceito dos 3Rs, o MAT, apesar de ser um teste validado internacionalmente^{17,25,26}, de fazer parte da Farmacopeia Europeia e de ser considerado no meio científico como um potencial substituto do Teste de Pirogênio em coelhos, ainda não foi implantado no Brasil de forma eficiente. Portanto, o objetivo desta revisão foi avaliar, utilizando como marco temporal o reconhecimento do MAT pela Farmacopeia Europeia, o uso de métodos alternativos ao Teste de Pirogênio *in vivo*, apontando os seus avanços e perspectivas e, desta forma, buscando contribuir para que o MAT possa ser reconhecido e aceito para fins regulatórios no Brasil.

MÉTODO

Foi realizada uma revisão da literatura, na qual foi formulada a seguinte questão norteadora (hipótese): o que tem sido investigado no meio científico sobre os métodos alternativos para avaliação da contaminação pirogênica após o MAT ter sido preconizado pela Farmacopeia Europeia?

Seleção dos estudos

Foram selecionados artigos científicos através de uma busca nos bancos de dados do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS - <http://brasil.bvs.br/>), no período entre setembro e outubro de 2017, utilizando as terminologias cadastradas como descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e *Medical Subject Headings* (MeSH) da U.S. *National Library of Medicine*. Os descritores utilizados foram (i) Pyrogens, (ii) Alternative Methods, e (iii) Validation.

Critérios de inclusão e exclusão

Os descritores foram cruzados e, após a leitura dos resumos, os artigos foram selecionados a partir do critério de inclusão “estar relacionado ao uso de métodos alternativos ao teste de pirogênio”. Os fatores de exclusão foram: i) artigos anteriores a 2010, isto é, os publicados entre janeiro de 2010 e outubro de 2017; ii) abordando exclusivamente o teste do LAL por ser este considerado um teste para endotoxina; iii) assuntos não relacionados (doenças específicas não relacionadas à detecção pirogênica, incluindo aspectos epidemiológicos, mecanismo de ação e tratamentos específicos, assim como, estudos relacionados ao meio ambiente - presença de pirogênios em água e solo,

iv) idioma (outros que não em inglês, espanhol e português), e v) artigos repetidos entre os cruzamentos dos descritores na mesma base de dados e entre as bases de dados.

Caracterização dos estudos

Após os cruzamentos dos descritores, os artigos selecionados foram separados por assuntos, buscando-se, desta forma, contemplar o maior número de informações. Os artigos selecionados foram categorizados da seguinte forma: (i) Aplicabilidade do MAT (ii) Comparação *in vivo* e *in vitro* (iii) Validação e, (iv) Artigos de revisão.

Avaliação crítica dos resultados

Foram separados os principais desfechos e recomendações de cada artigo, no qual buscou-se compreender, após uma confrontação dos dados, os principais fatores relacionados à limitação do uso do MAT, identificando as vantagens e desvantagens encontradas, assim como os produtos mais utilizados e os novos campos de aplicação dos métodos dentro da Biotecnologia.

RESULTADOS

Seleção dos Artigos

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 21 artigos pela busca na base de dados da BVS e 21 pelo PubMed, totalizando 42 artigos publicados a partir do ano de 2010. Após avaliação dos artigos repetidos entre as bases foram selecionados no total 24 artigos (Figura).

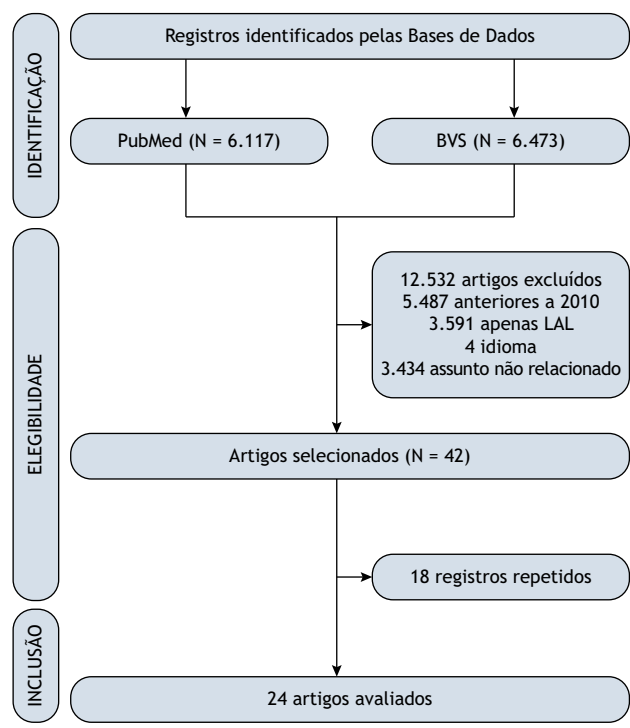


Figura. Fluxograma da busca e seleção de artigos, de acordo com o PRISMA Statement para revisões sistemáticas³¹.



Os artigos selecionados receberam códigos de identificação de A1 a A24 de acordo com o ano de publicação, período e país (Tabela 1). O período de publicação dos artigos foi de 2011 a 2017. As publicações ocorreram em vários países, sendo Alemanha e Brasil os com maior participação no número de publicações.

Caracterização dos estudos

Os artigos selecionados (A1 a A24) foram classificados por assunto, considerando-se, portanto, os principais pontos abordados (Tabela 1). A maior parte dos artigos científicos foi relacionada ao uso do MAT e desafios para sua ampla difusão (N = 8), seguidos dos artigos que fizeram uma avaliação em paralelo do MAT em relação ao Teste de Pirogênio *in vivo* (N = 7), alguns estudos sobre o processo de validação (N = 5) e estudos de revisão (N = 5) (Tabela 2).

Uso do MAT e desafios para sua ampla difusão

Foram selecionados oito artigos que versavam sobre a utilização do MAT, sendo a maior parte destes relacionados ao uso de novas fontes de monócitos, tais como as células monocíticas do sangue periférico, PBMC recém-obtidas, criopreservadas^{32,33,34,35,36} (A2, A8, A15, A20, A23) ou sangue total bovino^{37,38} (A10 e A11).

Stang et al.³⁹ (A9) apresentaram uma combinação do MAT utilizando sangue total humano com um sistema de incubação dinâmica na superfície de dispositivos médicos que proporcionou resultados altamente sensíveis para a detecção de lipopolissárido (LPS) e ácido lipoteicoico (ALT). Com o uso do novo sistema, foi possível detectar a contaminação no próprio dispositivo e não no seu eluído, como realizado nos testes de Pirogênio *in vivo* e LAL, além da redução do tempo de execução do MAT.

Os demais artigos foram relacionados ao uso de outras fontes de monócitos além do sangue total humano devido à dificuldade de obtenção do sangue de doadores, risco de flebotomia e possíveis alterações na liberação de citocinas no *pool* de doadores quando utilizado sangue total humano. Lekshmi et al.³² (A2) avaliaram o uso de PBMC criopreservadas em comparação ao uso do sangue humano, testando diferentes grupos sanguíneos, tanto para LPS (5UE) quanto para ALT (1µL). Os autores não encontraram diferenças significativas na liberação de IL-18 para PBMC em diferentes grupos sanguíneos. Além disso, IL-18 foi dependente da concentração de linfócitos. Desta forma, foi concluído que o sistema de linfócitos isolados pode ser utilizado como alternativa ao ensaio de pirogênios *in vivo*. Koryakina et al.³³ (A8), também propuseram a utilização de PBMC a partir de filtros leucocitários que são utilizados para a separação de sangue em centros de doação de sangue, e que acabam sendo considerados como resíduos biológicos. Foram utilizados diferentes tipos de pirogênios (endotoxina de referência da USP; LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*; Peptidoglicana - *S. aureus*; um ligante sintético PAM-3CSK4 e Flagelina de *Bacillus subtilis*), avaliando a ligação deles aos diferentes receptores semelhantes a Toll (TLRs, do inglês, *Toll-like receptors*) e seus respectivos mecanismos de ação. A metodologia foi validada de forma intralaboratorial, assim como exemplos da aplicação prática do uso de PBMC criopreservadas

para o MAT com amostras de drogas e vacinas. Solati et al.³⁴ (A15) avaliaram a liberação de IL-6 como resposta, após contaminar artificialmente um *pool* de PBMC criopreservadas com LPS e pirogênios não endotoxinas. O estudo demonstrou que diferentes *pools* de PBMC, frescos e criopreservados, tinham sensibilidade comparável, sendo altamente sensível, específico e reprodutível para quantificar contaminações pirogênicas em produtos farmacêuticos parenterais. Nordgren et al.³⁵ (A20) demonstraram o uso de PBMC criopreservadas e isoladas a partir das câmaras do sistema de leucoredução (LRSCs), um subproduto prontamente disponível da aferese plaquetária, como fonte de monócitos para o MAT. A validação intralaboratorial foi realizada por comparação direta com as duas fontes de monócitos primários mais comumente empregadas: WB e PBMC de sangue fresco, avaliando sua capacidade de detectar diferentes pirogênios (LPS, Pam3CSK4, ALT, Peptidoglicana, Poly (I:C) e Flagelina), semelhantes aos utilizados por Koryakina et al.³³. Foi avaliada a ligação das substâncias pirogênicas a diferentes TLRs, através da dosagem de IL-18 e IL-6. Todas as três fontes de células foram capazes de detectar os pirogênios incluídos no estudo com sensibilidades comparáveis, com exceção do Poly (I:C) para TLR3. O teste de WB produziu níveis de citocinas quantificáveis, porém significativamente mais baixos, com cada pirogênio testado do que qualquer das fontes de PBMC utilizadas. O último artigo selecionado foi Stoppelkamp et al.³⁶ (A23), o qual avaliou diferentes fontes de células monocíticas (PBMC de culturas primárias frente a culturas de linhagens celulares monocíticas) e demonstrou um aperfeiçoamento do método, através da aceleração do tempo de ensaio com o uso de propanol ou um aumento da produção de citocinas pelo aumento de temperatura de incubação. Este estudo apontou que, apesar de todos os monócitos serem capazes de detectar pirogênios, as células primárias eram mais sensíveis do que a linhagem celular monocítica, e que, o aumento da temperatura de incubação pode, finalmente, aumentar em até 13 vezes não apenas as respostas aos LPS, mas também a outros pirogênios.

Foram selecionados dois artigos^{37,38} (A10 e A11) que propuseram o uso do sangue bovino como fonte de monócitos como opção ao sangue total humano. Wunderlich et al.³⁷ utilizaram a detecção de IL-18, entretanto, os resultados apontaram que o sangue humano apresentou maior sensibilidade do que o bovino nos parâmetros avaliados. Em um segundo artigo, Wunderlich et al.³⁸ (2015) também avaliaram a detecção da prostaglandina E2 (PGE2) de sangue total bovino para testar a contaminação por endotoxina. Neste estudo, após incubação do sangue total bovino com LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (1,56 a 12,5 pg/mL), foi encontrado um aumento significativo da produção de PGE2 para as menores concentrações de LPS. Também foi testada a possibilidade de armazenar o sangue a 4 °C antes do uso o que produziu resultados positivos, pois a menor concentração de 1,56 pg/mL aumentou significativamente a produção de PGE2.

Comparação dos métodos *in vitro* e *in vivo*: avaliação em paralelo determinada pela Farmacopeia Europeia

Perdomo-Morales et al.¹⁹ (A1) compararam o Teste de Pirogênio *in vivo*, o MAT e o LAL paralelamente para 16 lotes de albumina



Tabela 1. Classificação dos artigos selecionados.

Classificação	Ano	Autor	Periódico	País
A1 Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin	2011	Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T.	ALTEX	Cuba
A2 Detection of interleukin -1 β from isolated human lymphocyte in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid	2012	Lekshmi, Niveditha; Geetha, Chandrika S; Mohanan, Parayanthala V.	Indian J Pharmacol	India
A3 Validation and quality control of replacement alternatives - current status and future challenges	2012	Marcel Leist, Nina Hasiwa, Mardas Daneshian and Thomas Hartung.	Toxicology Research	Alemanha
A4 Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test	2013	Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S et al.	ALTEX	Alemanha
A5 Implementing the in vitro pyrogen test: one more step toward replacing animal experimentation	2013	Hennig, Ulrike.	Altern Lab Anim	Alemanha
A6 Alternative methods in toxicity testing: the current approach	2014	Araújo GL, Campos MAA, Valente MAS, Silva SCT, França FD, Chaves MM et al.	Braz J Pharm Sci	Brasil
A7 Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation	2014	Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Grossman JH, McNeil SE.	Nanomedicine	Estados Unidos
A8 Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test	2014	Koryakina, Anna; Frey, Esther; Bruegger, Peter.	J Immunol Methods	Suíça
A9 Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test	2014	Stang K, Fennrich S, Krajewski S, Stoppelkamp S, Burgener IA, Wendel HP, Post M.	J Mater Sci Mater Med	Alemanha
A10 Pyrogen detection methods: comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT)	2014	Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M.	BMC Pharmacol Toxicol	Alemanha
A11 Prostaglandin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay	2015	Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M.	J Vet Pharmacol Ther	Alemanha
A12 Assessment of pyrogenic response of lipoteichoic acid by the monocyte activation test and the rabbit pyrogen test	2015	Gimenes, Izabela; Caldeira, Cristiane; Presgrave, Octavio Augusto França; de Moura, Wlamir Correa; Villas Boas, Maria Helena Simões.	Regul Toxicol Pharmacol	Brasil
A13 Soluble B-(1,3)-glucans enhance LPS-induced response in the monocyte activation test, but inhibit LPS-mediated febrile response in rabbits: Implications for pyrogenicity tests	2015	Pardo-Ruiz Z, Menéndez-Sardiñas DE, Pacios-Michelena A, Gabilondo-Ramírez T, Montero-Alejo V, Perdomo-Morales R.	Eur J Pharm Sci	Cuba
A14 Participation of Brazil in the World Congresses on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: an increase in commitment to the Three Rs	2015	Presgrave, Octavio; Caldeira, Cristiane; Moura, Wlamir; Cruz, Mayara; Méier, Gisele; Dos Santos, Elisabete; Boas, Maria H V.	Altern Lab Anim	Brasil
A15 An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells	2015	Solati S, Aarden L, Zeerleder S, Wouters D.	Innate Immun	Holanda
A16 The human whole blood pyrogen test - lessons learned in twenty years	2015	Hartung, Thomas.	ALTEX	Alemanha
A17 Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT)	2016	da Silva CC, Presgrave OA, Hartung T, de Moraes AM, Delgado IF.	Toxicol In Vitro	Brasil Estados Unidos e Alemanha
A18 International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods	2016	Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S et al.	Exp Med Biol	Itália Brasil China Japão Coreia do Sul Estados Unidos Reino Unido Canada
A19 More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives	2016	Fennrich, Stefan; Hennig, Ulrike; Toliashvili, Leila; Schlensak, Christian; Wendel, Hans Peter; Stoppelkamp, Sandra.	Altern Lab Anim	Alemanha
A20 Leukoreduction system chambers provide a valuable source of functional monocytes for the monocyte activation test by comparison with internationally validated methods	2016	Nordgren, Ida Karin.	J Immunol Methods	Reino Unido
A21 Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil	2016	Presgrave, Octavio; Moura, Wlamir; Caldeira, Cristiane; Pereira, Elisabete; Bôas, Maria H Villas; Eskes, Chantra.	Altern Lab Anim	Brasil Suíça
A22 Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines	2016	Vipond, Caroline; Findlay, Lucy; Feavers, Ian; Care, Rory.	ALTEX	Reino Unido
A23 Speeding up pyrogenicity testing: Identification of suitable cell components and readout parameters for an accelerated monocyte activation test (MAT)	2017	Stoppelkamp S, Würschum N, Stang K, Löder J, Avci-Adali M, Toliashvili L et al.	Drug Test Anal	Alemanha
A24 Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with Limulus amoebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay	2017	Abate W, Sattar AA, Liu J, Conway ME, Jackson SK.	Med Microbiol	Reino Unido



Tabela 2. Classificação dos artigos por assunto e os principais aspectos abordados.

Tema/Assunto	Classificação	Aspectos abordados
O uso do MAT e desafios para sua ampla difusão	A2, A8, A9, A10, A11, A15, A20, A23	Estudos que apontam o MAT como um potencial teste substitutivo, com o uso de diferentes fontes de monócitos e redução do tempo de execução.
Comparação <i>in vivo</i> vs. <i>in vitro</i>	A1, A7, A9, A12, A13, A17, A24 A3,A6	Regulamentação/legislação.
Validação	A14, A18, A21	Estes estudos seguiram a recomendação da Farmacopeia estudando a aplicabilidade do MAT em relação ao Teste <i>in vivo</i> para diferentes tipos de produtos injetáveis e pirogênicos não <i>in vitro</i> . Estes estudos avaliaram os processos de validação no Brasil e no mundo, assim como os aspectos regulatórios, legislação e participação em eventos.
Revisão	A4, A5, A16, A19, A22	Artigos que buscam avaliar os testes existentes, seus mecanismos de ação e sua aplicabilidade para o controle da qualidade de produtos biológicos, tais como vacinas. Também abordam o uso do MAT em áreas da Biotecnologia como as tecnologias celulares e avaliação da qualidade do ar.

sérica humana. Verificou-se que todos os lotes de albumina estavam contaminados com (1,3)- β -glucanas, que interferem com o LAL. A adição de polimixina B ao MAT demonstrou que os lotes pirogênicos foram principalmente contaminados com endotoxinas. No entanto, o LAL falhou ao detectar um deles. As concentrações equivalentes de endotoxina obtidas utilizando a leitura de IL-6 foram geralmente superiores àquelas que utilizam IL-1 β , provavelmente devido à indução direta de liberação de IL-6 de monócitos por (1,3)- β -glucanas. Também foi encontrada uma boa correlação entre o Teste de Pirogênio *in vivo* e o LAL. Um outro estudo, conduzido por da Silva et al.³ (A17), avaliou a aplicabilidade do MAT para 43 lotes de soros hiperimunes anteriormente testados no teste de pirogênicos. Os resultados mostraram que MAT apresentou 100% de sensibilidade (nenhum falso-negativo) e aproximadamente 85% de especificidade (15% falso-positivos). Os autores ressaltaram que estes resultados discordantes ocorreram nos casos de repetição do Teste de Pirogênio *in vivo* com resultado final negativo, onde o MAT apresentou resultado positivo. Os dados de Silva et al.³ apontaram que, devido à variabilidade biológica, os animais podem não detectar contaminações na dose limite, demonstrando, portanto, a maior sensibilidade do MAT nestes casos.

Dobrovolskaia et al.⁴⁰ (A7) avaliaram o desempenho do LAL cromogênico turbidimétrico e LAL gelificação na detecção de endotoxinas em nanoformulações de grau clínico. A interferência de nanopartículas com o teste LAL foi relatada para colóides metálicos, poliméricos nanopartículas, nanocristais e lipossomas. Portanto, os bioensaios, como o MAT, são úteis para verificar dados discrepantes no LAL, no entanto, a aplicabilidade desses testes é limitado a nanoformulações que não contêm agentes citotóxicos, uma vez que estes inibem a detecção de endotoxina.

A avaliação de pirogênicos não endotoxina, usando a avaliação em paralelo *in vivo* e *in vitro*, foi apresentada por Gimenes et al.⁴¹ (A12), e Pardo-Ruiz et al.⁴² (A13). O primeiro artigo avaliou as respostas pirogênicas induzidas por ALT (de *S. aureus* do Teste de Pirogênio *in vivo* e o MAT induzidas por ALT de *S. aureus*. Diferentes concentrações de ALT foram testadas pelo MAT em paralelo ao teste de pirogênio demonstrado que o MAT foi mais sensível do que o Teste de Pirogênio na detecção do ALT⁴¹. Pardo-Ruiz et al.⁴² determinaram a influência de (1,3)- β -glucanas na resposta de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS no MAT e no teste

de pirogênicos, avaliando assim, o efeito resultante no resultado de cada teste. Verificou-se que as (1,3)- β -glucanas provocaram a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , mas não o suficiente para classificá-las como pirogênicas de acordo com o MAT. As mesmas amostras de (1,3)- β -glucanas não foram consideradas pirogênicas no Teste de Pirogênio *in vivo*, mas, aumentaram significativamente a resposta de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS no MAT, de tal forma que as amostras que contêm concentrações não pirogênicas de LPS tornaram-se pirogênicas. Por outro lado, as (1,3)- β -glucanas não tiveram efeito sobre as doses de LPS sub-pirogênicas no teste *in vivo*, mas surpreendentemente, inibiram a resposta febril induzida por LPS. Portanto, enquanto as (1,3)- β -glucanas podem mascarar a atividade pirogênica do LPS nos coelhos, elas exercem uma superestimulação de citocinas pró-inflamatórias no MAT. Assim, o MAT proporciona maior segurança, pois evidencia uma resposta biológica indesejada, que não é completamente controlada e é negligenciada no teste em animais.

Por fim, Abate et al.⁴³ (A24) compararam MAT, LAL e rFC (Fator recombinante C sintético), propondo o rFC (PyroGene[®]) como um novo sistema de detecção de LPS simples, específico e sensível. O rFC detectou a maioria das estruturas de LPS em quantidades de picogramas e a potência do LPS não foi diferente da medida pelo LAL. No entanto, as reatividades de *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Bordetella pertussis* e *P. aeruginosa* diferiram significativamente entre estes ensaios. A análise de correlação em pares revelou que apenas o teste de PyroGene[®] produziu uma correlação positiva significativa com a liberação de IL-6 com o MAT.

Processo de validação dos métodos alternativos

De 2010 até hoje, foram selecionados quatro artigos^{44,45,46,47} (A3, A14, A18, A21) relacionados ao processo de validação de métodos alternativos para detecção de contaminação pirogênica. Leist et al.⁴⁴ (A3) abordaram a importância da validação de um novo método, na qual o pré-requisito de todos os esforços deve ser a padronização e a documentação do teste. Isso inclui também a aplicação de medidas de garantia de qualidade, como as Boas Práticas de Cultivo Celular (GCCP, do inglês *Good Cell Culture Practice*) e de Boas Práticas de Laboratório (GLP, do inglês *Good Laboratory Practice*). Os três principais requisitos básicos



a serem cumpridos também foram descritos: (a) reprodutibilidade: deve ser repetitiva por qualquer pessoa especialista na técnica e em qualquer local; (b) relevância científica: a razão para a validação deve ser clara e, o mais importante, deve ser incorporado em um contexto biológico plausível, (c) hipótese, definição clara do que se deseja obter para se ter uma predição do modelo aplicado. Assim como, as quatro etapas para a validação de um modelo substitutivo animal: (aa) sistema biológico; (bb) esquema de exposição, (cc) ponto final do ensaio; (dd) procedimento de análise de dados/modelo de previsão. Este é um passo importante, já que o procedimento de análise de dados ou modelo de previsão de um método alternativo deve ser formalizado como um modelo de previsão, com capacidade para produzir resultados que se correlacionam bem com a realidade. Este estudo também demonstra, entre outros testes substitutivos, a importância de substituição do Teste de Pirogênio *in vivo* pelas cinco variantes do MAT, afirmando sua capacidade para detectar pirogênios, e podendo levar a uma substituição completa do teste de coelho no futuro próximo.

Barroso et al.⁴⁶ (A18) avaliaram o desenvolvimento e a validação de alternativas científicas para testes em animais, não somente a partir de uma perspectiva ética (implementação de 3Rs), mas também na tomada de decisão de avaliação de segurança com o uso de informações mecanísticas de maior relevância para seres humanos. Para ser eficaz nesses esforços, foi ressaltada a importância de uma boa interação entre dos centros de validação mundiais, a indústria, os órgãos reguladores, a academia e outras partes interessadas que assegurem uma forte cooperação internacional, colaboração intersetorial e intensa comunicação no projeto, execução e revisão por pares de estudos de validação. Essa abordagem pode acelerar a aceitação internacional de métodos pelas autoridades reguladoras e sua implementação e uso pelas partes interessadas. Também permite alcançar maior eficiência e eficácia, evitando a duplicação de esforços e alavancando recursos limitados. Os autores também ressaltam a criação em 2009 da Cooperação Internacional em Métodos de Teste Alternativos (ICATM), composta por centros de validação da Europa, EUA, Canadá e Japão. Vale ressaltar que o ICATM foi mais tarde acompanhado pela Coreia do Sul, em 2011, e atualmente conta também com o Brasil e a China como observadores.

No Brasil, Presgrave et al.⁴⁵ (A14) publicaram um levantamento dos grupos de pesquisa que estão atuando na área de métodos alternativos. Os autores apontam que a maioria destes grupos já trabalha no tema há algumas décadas, mas de forma isolada. Apesar dos problemas, desde o Terceiro Congresso Mundial sobre Alternativas e Uso Animal nas Ciências da Vida (WCs), os pesquisadores brasileiros têm participado fortemente não só na apresentação de pôsteres, mas também por apresentações orais e até mesmo no Comitê de WCs. O Brasil foi o único país sul-americano que participou do Painel de Avaliação do Programa no WC7 (25 especialistas da Europa, 15 da América do Norte, três da Ásia, um da Oceania e um da América do Sul). No WC9, o Brasil alcançou uma de suas maiores participações apresentando 41 resumos e nove apresentações orais. O estudo deixa claro o aumento da participação em eventos internacionais mostrando

que o Brasil é um parceiro poderoso para colaborações internacionais no campo de métodos alternativos. Em outro artigo, Presgrave et al.⁴⁷ (A21) demonstraram a importância do estabelecimento de regras definidas do processo de validação, propondo um modelo seguindo o guia 34 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*)⁴⁸ e aos moldes dos outros centros de validação. Dentro deste processo, o BraCVAM possui papel central, identificando e/ou recebendo solicitações de partes interessadas em enviar os testes para validação, e coordenando ou organizando os estudos de validação dos ensaios selecionados. Um grupo gestor supervisiona o estudo de validação, e os resultados obtidos devem ser revisados por um Comitê de Revisão Científica *ad hoc*, organizado sob a supervisão do BraCVAM. Com base no resultado da revisão pelos pares, o BraCVAM prepara as recomendações sobre o método validado, que será enviado ao Concea, que finaliza o processo sendo o responsável pela adoção regulatória de todos os métodos de teste validados no Brasil, após uma consulta pública aberta. Desta forma, os autores concluem que o trabalho em conjunto entre o Concea, o BraCVAM e a RENAMA contribuem significativamente para o desenvolvimento dos métodos alternativos no Brasil.

Araujo et al.⁴⁹ (A6) abordaram a validação e o controle da qualidade dos métodos alternativos no Brasil e no mundo. A revisão foi baseada principalmente no processo de validação, destacando o papel dos principais órgãos regulatórios e centros de validação, considerando iniciativas governamentais, estudos baseados na filosofia dos 3Rs, as iniciativas para o avanço de métodos alternativos, e uma descrição dos principais métodos alternativos utilizados. Os autores ressaltaram a importância do BraCVAM na incorporação de novas metodologias, principalmente na validação por captura, e assim, o desenvolvimento de novos métodos para avaliação da segurança das substâncias. O estudo ressalta que os animais ainda são necessários em algumas áreas e que nem todos os testes *in vitro* conseguem prever de forma confiável a toxicidade *in vivo*. Portanto, tanto a padronização quanto a validação e a implementação de métodos alternativos exigem o envolvimento de várias agências reguladoras, que devem assumir a responsabilidade para orientar o processo de desenvolvimento de novas metodologias.

Artigos de revisão: comparação entre os métodos e necessidade de novos campos de aplicação

Hasiwa et al.⁴ (A4) apontaram que o MAT foi capaz de cobrir a totalidade dos possíveis pirogênios relevantes para os seres humanos e que não foram incluídos nas validações sobre o MAT da última década. Nesta revisão, foram agrupadas evidências da literatura publicada, dados não publicados e os resultados do estudo de validação internacional mostrando evidências científicas que o sangue total detecta de forma confiável os pirogênios não endotoxinas, sendo desnecessários novos estudos de validação. Os autores destacaram que, apesar do LAL ter sido um avanço significativo, substituindo o teste de coelho que era caro e propenso a erros, o LAL não reflete a reação da febre humana, devido a um mecanismo subjacente completamente diferente,



que é o principal indicador da resposta humana em relação a substâncias pirogênicas. Aponta que não há correlação da atividade LAL com a expressão de citocinas em células mononucleares. Outra desvantagem levantada pelos autores, diz respeito ao fato do LAL ser utilizado para amostras líquidas, criando dificuldades para as análises de materiais sólidos, como os dispositivos médicos, dos quais apenas as soluções de rinsagem podem ser testadas. Da mesma forma, o ensaio tem problemas com fluidos de diálise, lipossomas, nanopartículas e tecnologias celulares. As drogas que interferem com o sistema de coagulação, isto é, através da inibição ou aumento (alto teor de proteínas, proteases), não podem ser testadas pelo LAL. A cascata de reações do LAL também é desencadeada pelas (1,3)- β -glucanas e outros polissacarídeos, por exemplo, a partir de materiais filtrantes de celulose, o que pode resultar em falso-positivos. Vale ressaltar a análise aprofundada dos mecanismos de interação dos diferentes tipos de pirogênicos aos TLRs da superfície dos monócitos e os vários relatos de reações clínicas adversas de febre em pacientes, por exemplo, pela administração de albumina sérica humana e produtos de diálise, com resultados anteriores satisfatórios (“sem pirogênio”) pelo LAL e/ou o Teste de pirogênio *in vivo*, porém insatisfatórios pelo MAT (“com pirogênio”). Portanto, segundo os autores, tendo em vista o conhecimento acumulado, o MAT pode ser utilizado na avaliação do controle da qualidade de forma segura e confiável não havendo para isso a necessidade de novos estudos de validação.

Henning⁵⁰ (A5) abordou um novo aspecto sobre o uso do MAT no que diz respeito ao regulamento mais importante para a indústria farmacêutica as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e as Boas Práticas de Fabricação. O estudo destaca a importância do MAT para avaliação dos dispositivos médicos como alternativa ao uso de animais, já que estes podem ser regulados separadamente por diretrizes ISO, onde são aplicadas a BPL. Desta forma, pode-se detectar todos os pirogênicos antes restritos a endotoxinas, possibilitando a disponibilidade de dados mais relevantes para calcular os riscos relacionados à saúde. Hartung⁵¹ (A16) publicou um estudo retrospectivo sobre os últimos vinte anos do MAT desde que este foi descrito pela primeira vez. O artigo analisa seu processo de desenvolvimento, o *status* do teste, bem como os desafios e oportunidades perdidas, como sua implementação em tecnologias celulares, incluindo transfusões de sangue e dispositivos médicos, e sua relevante contribuição na avaliação de pirogênicos no ar, e assim na prevenção de doenças pulmonares obstrutivas crônicas e asma infantil. Outro ponto importante foi o aumento do número de animais utilizados para o teste de pirogênicos, que aumentou em cerca de 10.000 para 170.000 na União Europeia desde a aceitação do MAT em 2010. Isso foi devido ao fato da Farmacopeia Europeia ter introduzido o teste para parenterais de pequenos volumes (até 25 mL), no qual muitos destes produtos são lipofílicos e não podem ser testados em LAL e, portanto, são testados no teste de pirogênio. Segundo o autor, até agora não foi encontrado nenhum produto que não pudesse ser testado por, pelo menos, uma das variantes do MAT, que não podem ser testados nos coelhos ou no LAL, tais como tecnologias celulares, materiais sólidos ou substâncias citotóxicas. E ainda, segundo o autor, não há razão para o sangue humano ser

considerado um fator limitante para utilização do MAT em larga escala, dado que a doação de sangue de 500 mL é suficiente para mais de 50.000 testes.

No ano seguinte, Fennrich et al.¹⁵ (A19) apresentaram uma complexa revisão sobre os últimos setenta anos do teste de pirogênio, destacando a importância do seu uso no controle da qualidade de produtos injetáveis. Ressaltou seu uso para a detecção de endotoxinas e não endotoxinas que não são eliminados nos processos de esterilização tradicionais e que podem causar efeitos adversos no homem. Fez uma comparação histórica sobre o Teste de Pirogênio *in vivo*, o LAL (gelificação/cromogênio e turbidimétrico) e o MAT, ressaltando a importância do MAT e o seu potencial de método substitutivo principalmente para dispositivos médicos e a contaminação do ar, nos quais o LAL e o teste de pirogênicos não podem ser aplicados ou limitados (uso do eluente no caso dos dispositivos médicos, por exemplo). Ressaltou que o MAT pode ser usado em contato direto com o artigo de saúde e estudos desta natureza devem ser estimulados, de forma que possam ser revistos valores de referência levando em consideração o tipo de artigo em saúde e sua aplicação. Ressaltou também a importância do MAT para a detecção de pirogênicos em produtos biológicos, principalmente em lotes de vacinas como a vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo B onde normalmente os resultados do LAL são inconsistentes devido a presença de não endotoxinas como os toxoides (*Clostridium diphtheriae* e *Clostridium tetani*). Um outro aspecto importante são os aprimoramentos para o teste de endotoxina através do uso do rFC. Existe atualmente uma grande preocupação com a utilização do *L. polyphemus*, já que a extração da hemolinfa causa uma taxa de mortalidade de 10% a 30% assim como um aumento da taxa de morbidade em até seis meses após a extração da hemolinfa. Além disso, o uso do rFC com detecção por fluorescência (PyroGene[®]) diminui a taxa de falso-positivos, já que não é induzido por outros pirogênicos não endotoxinas, os quais ativam outra via semelhante (fator G) no LAL. Estudos são ainda escassos, uma vez que o rFC ainda não pode ser usado para misturas complexas (heterogêneas) por ser susceptível a interferentes. Um outro *kit* de rFC (EndoLISA[®]) tem sido usado com bons resultados para misturas heterogêneas, entretanto ainda apresenta alguns resultados falso-positivos.

O artigo mais recente foi publicado por Vipond et al.⁵² (A22), buscando a avaliação das limitações de utilização do teste de pirogênio para vacinas contendo vesículas de membrana externa. Segundo os autores, o uso de animais não é adequado como teste de segurança para esses produtos devido aos altos níveis de endotoxina presentes na vacina que geram uma resposta pirogênica em coelhos quando administrados sem diluição por via intravenosa. Se o Teste de Pirogênio *in vivo* for usado para medir o conteúdo de pirogênicos de uma vacina contendo vesículas de membrana externa (OMVs, sigla do inglês, *Outer Membrane Vesicles*), a dose de desafio ($\mu\text{g}/\text{kg}$) utilizada deve ser a dose máxima não pirogênica obtida para lotes considerados seguros (não reativos ou aceitáveis) em testes clínicos. O raciocínio dessa abordagem é que o teste deve discriminar um lote que é mais pirogênico do que aqueles usados em ensaios clínicos. O seu uso como teste de consistência também é ambíguo, uma



vez que o teste é qualitativo e não quantitativo, além da variabilidade do modelo animal. Além disso, há evidências de que a medição do aumento de temperatura dos animais ao longo de três horas não captura a resposta máxima de febre. Finalmente, o artigo considera o uso do MAT como um método alternativo, que fornece dados quantitativos em um sistema que mede respostas inflamatórias humanas e, portanto, poderia ser utilizado na lógica da análise de consistência para garantir a segurança, eficácia e qualidade de vacinas.

DISCUSSÃO

Apesar de a legislação europeia (Diretiva da EU 2010/63/EU)⁵³ e a legislação brasileira^{28,54} (Lei no 11.794/2008²⁹ e Lei no 9.605/1998²⁸) estarem firmemente baseadas no princípio dos 3Rs, o MAT ainda tem sido pouco utilizado como teste de pirogênio. Cabe ressaltar que a Resolução nº 37, de 6 de julho de 2009, da Anvisa⁵⁵ no seu art. 1º, explicita que na ausência de monografia oficial de métodos gerais inscritos na Farmacopeia Brasileira, poderá ser adotada monografia oficial da última edição de compêndios internacionais como a Farmacopeia Europeia, e desta forma, o MAT, poderia ser utilizado como método oficial no Brasil. Entretanto, o fato do MAT não ter sido inserido na Resolução Normativa nº 31/2016 do Concea¹⁴ pode ter contribuído para o seu uso atualmente limitado.

Apesar das vantagens do ponto de vista ético e de segurança na liberação de lotes de produtos injetáveis, ainda não há uma política de aceitação regulatória principalmente no Brasil como revisado por da Silva et al.⁵⁶ e Navega et al.⁵⁷, que reavaliaram o impacto do uso de animais e eficácia do Teste de Pirogênio *in vivo* nesta área. O aspecto econômico também pode ser um diferencial do MAT em relação ao Teste de Pirogênio *in vivo*, no qual os custos de manutenção de biotérios são bem elevados. A monografia da Farmacopeia Europeia não exige kits de imunodeteção de marcas específicas, sendo aceito o uso de qualquer kit preparado no próprio laboratório, com os componentes adquiridos separadamente, o que pode reduzir os custos do MAT. Apesar do livre uso, desde 1996 vários licenciadores se interessaram na produção e comercialização de kits de imunodeteção *in vitro* específicos para a dosagem de citocinas no MAT como por exemplo, *Pyrocheck* 1996-2000; *In-vitro Pyrogen Test*, IPT 2001-2008; *PyroDetect* 2009-2011 e, *PyroDetect* Merck a partir de 2012. Estes kits eram praticamente idênticos, pois cada um continha o mesmo Elisa, materiais de referência de endotoxina que foram calibrados em relação ao padrão internacional e o LTA⁵¹. O LAL tem sido mais utilizado nas últimas décadas pelos reguladores e a indústria devido ao fato de ser mais rápido e apresentar menor custo.

No entanto, as variações na sensibilidade e especificidade do LAL para endotoxina e a preocupação com uso da hemolinfa do *L. polyphemus* estão representando desafios crescentes para a indústria de Biotecnologia. Isso exigiu a inovação usando a tecnologia recombinante de um teste alternativo para endotoxina, o rFC. Apesar de ter sido reconhecido na RN nº 31/2016 pelo Concea como um teste para avaliar a contaminação pirogênica,

o LAL pode ser apenas considerado como um substituto parcial do teste de Pirogênio *in vivo*, já que não detecta outros pirogênios¹⁴. A própria resolução define as aplicações específicas de cada um dos métodos, bem como a determinação de se destinarem à substituição total, à substituição parcial ou à redução. A necessidade de reconhecimento por parte do Concea de um teste que possa ser considerado como um substituto total, como o MAT, faria com que centenas de coelhos deixassem de ser utilizados tanto nas etapas de produção como no controle da qualidade de medicamentos, produtos biológicos e artigos de saúde^{51,56}. Apesar da Farmacopeia Europeia só recentemente ter reconhecido o MAT como substitutivo para a detecção de endotoxina⁸, os estudos selecionados demonstraram o potencial do MAT como o melhor método alternativo para detectar tanto a endotoxina como outras classes de pirogênios em medicamentos, vacinas e soros hiperimunes. Contudo, um dos principais obstáculos e a principal razão para a aplicação limitada do MAT estão relacionados à obtenção do sangue total humano. A metodologia para a criopreservação de PBMC pode contornar este problema podendo fornecer bancos de células para cada doador a partir dos filtros ou câmaras leucocitárias utilizadas como resíduos biológicos de banco de sangue. Outra opção seria o uso do sangue total bovino, embora neste caso haja a extrapolação de espécies e a perpetuação do uso de animais. O sangue total humano também pode ser obtido através de parcerias com bancos de sangue, já que a quantidade utilizada por teste é muito pequena (50 µL/poço = 4 poços 1 teste). Uma outra limitação pode ser o tempo de execução do MAT, que são de dois dias, o que tem sido contornado através de um aperfeiçoamento do método proporcionando aceleração do tempo de ensaio³⁵. Deve ser enfatizado que a Farmacopeia Europeia preconiza que para cada novo produto deve ser submetido uma validação específica em paralelo ao ensaio em coelho.

O ICCVAM²⁷, em 2008, quando recomendou o uso do MAT apenas como terceiro teste para endotoxinas apontou a falta de estudos para produtos biológicos e dispositivos médicos, além da detecção de pirogênios não endotoxinas. Pode ser observado que vários estudos experimentais foram realizados para soros hiperimunes, albuminas e dispositivos médicos, sendo que estes últimos demonstraram a superioridade do MAT por tornar possível o contato direto com o material e não do eluente, como no caso do LAL e do Teste de Pirogênio *in vivo*. No caso dos dispositivos médicos, o uso do MAT antes da aplicação clínica tem o potencial de reduzir significativamente as complicações associadas ao seu uso.

Os estudos de comparação também deixam claro que, no caso de produtos biológicos, o MAT possui resultados melhores quando comparados ao teste em coelhos e ao LAL, mesmo quando estes são preconizados por farmacopeias. Também o MAT demonstrou alta sensibilidade e especificidade na detecção de pirogênios não endotoxina como o ALT e β-glucanas, sendo este último interferente no teste LAL. Dependendo das propriedades do produto, deve ser considerado no resultado a possibilidade destes interferentes no produto ou mesmo a presença de vários contaminantes diferentes em variáveis proporções, sendo o MAT mais seguro nestas situações.



Novos campos de aplicação

A falta de reconhecimento do MAT por parte da área regulatória também impede o seu uso em várias áreas da Biotecnologia, nas quais a detecção de pirogênios é imprescindível e, muitas vezes nem o LAL e nem o Teste de Pirogênio *in vivo* são aplicáveis. Estes campos incluem nanoformulações de uso clínico, que podem ter suas propriedades alteradas pela presença de endotoxinas. O MAT também poderia ser utilizado para avaliar a contaminação em tecnologias celulares que incluem uma grande variedade de células, como condrócitos, células-tronco (hematopoiéticas), células de medula óssea e células sanguíneas, como linfócitos ativadas, e os produtos tradicionais de bolsas de eritrócitos e plaquetas. O risco de contaminação em transfusões e outros procedimentos poderia também ser reduzido com a implantação do MAT antes dos procedimentos. O uso do MAT para avaliação em próteses, implantes e luvas também evitariam grandes riscos a população. Um outro campo seria a utilização do MAT na avaliação da contaminação do ar estabelecendo novos parâmetros e uma abordagem da carga biológica contida no ar.

Avanços e perspectivas no Brasil

O MAT tem sido utilizado no Brasil para pesquisa, principalmente no campo de métodos alternativos. Entretanto, as dificuldades encontradas por grupos que trabalham de forma isolada têm dificultado a ampla implantação do método. A iniciativa da RENAMA/MCTIC, através de projetos via editais do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), possibilitou a criação de um consórcio, voltado para o “estudo da aplicabilidade, aprimoramento e disseminação nacional de métodos alternativos para a detecção da contaminação pirogênica em produtos para a saúde” (Projeto CNPq nº 442870/2016-7). Essa iniciativa, que envolve pesquisadores do setor regulatório, da academia e dos laboratórios produtores, demonstra avanço no âmbito nacional e a possibilidade de gerar dados e consensos relacionados à aplicabilidade de métodos *in vitro* para a avaliação da contaminação pirogênica em produtos biológicos, próteses dentárias, entre outros, assim como a formação de um banco de células monocíticas, que poderão ser utilizados por várias instituições. Os resultados do consórcio, portanto, poderão servir de base a solução de limitações e promoção da ampla utilização do MAT. Uma possível proposta a ser avaliada é a de que o LAL e o MAT sejam usados

em bateria, de forma que resultados negativos no LAL possam ser investigados no MAT, não só na pesquisa, mas sobretudo no controle da qualidade e liberação de lotes de produtos para a saúde. Espera-se, ainda, com as iniciativas apoiadas pela RENAMA/MCTIC: (i) a formação de recursos humanos especializados e com alta qualificação para o atendimento de demandas das indústrias farmacêuticas e de biotecnologia, na realização de ensaios validados e padronizados; (ii) a transferência de tecnologia ao setor produtivo brasileiro, contribuindo para uma indústria mais competitiva, e capaz de transpor potenciais barreiras comerciais impostas por uma legislação internacional cada vez mais sensível a questões éticas no uso de animais em testes de insumos biológicos e, por fim, (iii) a ampliação da interatividade de grupos de pesquisa brasileiros, a partir de cooperações de diferentes instituições científicas, concatenadas e comprometidas na prática de uma ciência mais cooperativa, interdisciplinar e translacional.

Uma vez que a nossa legislação não permite usar um teste *in vivo*, uma vez que exista uma alternativa, é imprescindível a harmonização de procedimentos para que, como no caso do teste de pirogênio, métodos alternativos possam efetivamente ser utilizados para fins regulatórios.

CONCLUSÕES

A Resolução nº 37/2009 da Anvisa⁵⁵ permite que o MAT possa ser utilizado como monografia oficial, já que faz parte da Farmacopeia Europeia como método substitutivo para endotoxina. Tal reconhecimento auxiliaria para o avanço científico e bem-estar animal e contribuiria para a implantação do MAT como método alternativo dentro dos testes de segurança toxicológicos utilizados no controle da qualidade de produtos. Os artigos selecionados evidenciam que o MAT pode ser utilizado para uma variedade de produtos para saúde e com aplicação potencial para novas tecnologias, incluindo as tecnologias celulares, nas quais muitas vezes o LAL não pode ser usado. A utilização de métodos mais sensíveis, robustos e validados como alternativas ao uso de animais contribui para uma ciência mais ética, e implica na redução imediata do uso de animais, assim como nos custos e no tempo de liberação de laudos analíticos para o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e lotes de produtos para exportação ou uso em Programas governamentais, como por exemplo, o Programa Nacional de Imunizações (PNI-MS).

REFERÊNCIAS

1. Williams LK. Endotoxins: pirogens, LAL testing and depyrogenation. 2.ed. New York: Marcel Dekker; 2007.
2. Melandri V, Faria G, Caldeira C, Presgrave O. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à vigilância sanitária. *Universitas Cienc Saúde*. 2010;8(2):69-95. <https://doi.org/10.5102/ucs.v8i2.1150>
3. Silva CC, Presgrave OA, Hartung T, Moraes AM, Delgado IF. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicol In Vitro*. 2016;32:70-5. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.004>
4. Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEx*. 2013;30(2):169-208. <https://doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>



5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Pirogênios. In: Farmacopeia brasileira. 5a ed. Brasília, DF: Anvisa, 2010. Pirogênios, Vol. 1, p. 229-30.
6. U. S. Pharmacopeia. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2009. Pyrogen test, .32/NF 27.
7. Council of Europe. European Pharmacopoeia Commission. Monocyte activation test: general method 2.6.30. 6th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2010.
8. Council of Europe. European Pharmacopoeia Commission. Monocyte activation test: general method 2.6.30. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017.
9. Hort EC, Penfold WJ. The dangers of saline injections. *BMJ*. 1911;2(2659):1589-91. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2659.1589>
10. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Baltimore: Johns Hopkins University; 1959.
11. Levin J, Bang FB. A. Description of cellular coagulation in the limulus. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1964;115:337-45.
12. United States Pharmacopeia, National Formulary. United States pharmacopeia. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 1980.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia brasileira. 4a ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 1996.
14. Brasil. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece o uso no país de métodos alternativos validados, que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. *Diário Oficial União*. 18 ago 2016.
15. Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stoppelkamp S. More than 70 years of pyrogen detection: current state and future perspectives. *Altern Lab Anim*. 2016;44(3):239-53.
16. Hartung T, Aaberge I, Berthold S, Carlin G, Charton E, Coecke S et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction: the report and recommendations of ECVAM Workshop 43. *Altern Lab Anim*. 2001;29(2):99-123.
17. Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J Immunol Methods*. 2005;298(1-2):161-73. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.01.010>
18. Schindler S, von Aulock S, Daneshian M, Hartung T. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. *ALTEX*. 2009;26(4):265-77. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.4.265>
19. Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX*. 2011;28(3):227-35. <https://doi.org/10.14573/altex.2011.3.227>
20. Poole S, Thorpe R, Meager A, Hubbard AR, Gearing AJ. Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet*. 1988;1(8577):130. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90338-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90338-8)
21. Taktak YS, Selkirk S, Bristow AF, Carpenter A, Ball C, Rafferty B et al. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(8):578-82. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03540.x>
22. Hartung T, Wendel A. Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Toxicol*. 1996;9(4):353-9.
23. Eperon S, Jungi TW. The use of human monocytoïd lines as indicators of endotoxin. *J Immunol Methods*. 1996;194(2):121-9. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00073-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00073-7)
24. Eperon S, De Groote D, Werner-Felmayer G, Jungi TW. Human monocytoïd cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and *Limulus amoebocyte* lysate assay. *J Immunol Methods*. 1997;207(2):135-45. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00112-9)
25. Schindler S, Asmus S, Aulock S, Wendel A, Hartung T, Fennrich S. Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):89-100. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.019>
26. Schindler S, Spreitzer I, Löschner B, Hoffmann S, Hennes K, Halder M et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *J Immunol Methods*. 2006;316(1-2):42-51. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.023>
27. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM. ICCVAM test method evaluation report: validation status of five in vitro test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. Reserch Triangle Park: National Institute of Environmental Health Sciences; 2008 [acesso 01 de out 2017]. (NIH Publication, Vol. 8-6391) Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/pyrogen/TMER/PyroTMER2008.pdf>
28. Brasil. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 9 out 2008.
29. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz. Criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos: extrato de acordo de cooperação técnica. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2012.
30. Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Portaria Nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI. *Diário Oficial União*. 5 jul 2012.
31. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for



- systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med.* 2009;151(4):264-9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>
32. Lekshmi N, Geetha CS, Mohanan PV. Detection of interleukin -1B from isolated human lymphocyte in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(6):726-31. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.103269>
33. Koryakina A, Frey E, Bruegger P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *J Immunol Methods.* 2014;405:181-91. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.01.005>
34. Solati S, Aarden L, Zeerleder S, Wouters D. An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells. *Innate Immun.* 2015; 21(7):677-84. <https://doi.org/10.1177/1753425915583365>
35. Nordgren IK. Leukoreduction system chambers provide a valuable source of functional monocytes for the monocyte activation test by comparison with internationally validated methods. *J Immunol Methods.* 2016;428:42-9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.12.001>
36. Stoppelkamp S, Würschum N, Stang K, Löder J, Avci-Adali M, Toliashvili L et al. Speeding up pyrogenicity testing: identification of suitable cell components and readout parameters for an accelerated monocyte activation test (MAT). *Drug Test Anal.* 2017;9(2):260-73. <https://doi.org/10.1002/dta.1973>
37. Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M. Pyrogen detection methods: comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). *BMC Pharmacol Toxicol.* 2014;15(1):50. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-50>
38. Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M. Prostaglandin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay. *J Vet Pharmacol Ther.* 2015;38(2):196-8. <https://doi.org/10.1111/jvp.12148>
39. Stang K, Fennrich S, Krajewski S, et al. Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test. *J Mater Sci Mater Med.* 2014 Apr;25(4):1065-75. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5136-6>.
40. Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Grossman JH, McNeil SE. Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(12):1847-56. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.157>
41. Gimenes I, Caldeira C, Presgrave OA, de Moura WC, Villas Boas MH. Assessment of pyrogenic response of lipoteichoic acid by the monocyte activation test and the rabbit pyrogen test. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015;73(1):356-60. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.07.025>
42. Pardo-Ruiz Z, Menéndez-Sardiñas DE, Pacios-Michelena A, Gabilondo-Ramírez T, Montero-Alejo V, Perdomo-Morales R. Soluble β -(1,3)-glucans enhance LPS-induced response in the monocyte activation test, but inhibit LPS-mediated febrile response in rabbits: implications for pyrogenicity tests. *Eur J Pharm Sci.* 2016;81:18-26. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.018>
43. Abate W, Sattar AA, Liu J, Conway ME, Jackson SK. Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with *Limulus* ameobocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. *J Med Microbiol.* 2017;66(7):888-97. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000510>
44. Leist M, Hasiwa N, Daneshian M, Hartung T. Validation and quality control of replacement alternatives: current status and future challenges. *Toxicol Res.* 2012;1(1):8-22. <https://doi.org/10.1039/c2tx20011b>
45. Presgrave O, Caldeira C, Moura W, Cruz M, Méier G, Santos E et al. Participation of Brazil in the World Congresses on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: an increase in commitment to the Three Rs. *Altern Lab Anim.* 2015;43(1):69-72.
46. Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S et al. International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods. *Adv Exp Med Biol.* 2016;856:343-86. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33826-2_14
47. Presgrave OA, Moura W, Caldeira C et al. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation 838 in Brazil. *Altern Lab Anim.* 2016;44(1):85-90.
48. Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, 2005. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2005. (OECD. Series on testing and assessment, Vol. 34).
49. Araújo GL, Campos MAA, Valente MAS, Silva SCT, França FD, Chaves MM et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz J Pharm Sci.* 2014;50(1):55-62. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
50. Hennig, Ulrike. Implementing the in vitro pyrogen test: one more step toward replacing animal experimentation. *Altern Lab Anim.* 2013;41(5):58-60.
51. Hartung T. The human whole blood pyrogen test: lessons learned in twenty years. *ALTEX.* 2015; 32(2):79-100. <https://doi.org/10.14573/altex.1503241>
52. Vipond C, Findlay L, Feavers I, et al. Limitations of the rabbit pyrogen test 853 for assessing meningococcal OMV based vaccines. *ALTEX;* 33(1): 47-53, 2016.
53. European Union. Directive 2010/63/Eu. On the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal. 22 sep 2010.
54. Brasil. Lei Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções 760 penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial União. 13 fev 1998.
55. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 37, de 6 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopeias estrangeiras. Diário Oficial União. 8 jul 2009.



56. Silva CC, Cruz M, Freitas JC, Presgrave O, Moraes A, Delgado IF. Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênios no controle da qualidade de produtos injetáveis. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):41-6. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00519>

57. Navega ECA, Silva CC, Presgrave OAF, Almeida AS, Delgado IF, Mattos KA. Métodos alternativos ao uso de animais para a detecção de pirogênio: oportunidades e desafios no controle da qualidade de produtos. *Arch Veter Sci*. 2015;20(4):71-9. <https://doi.org/10.5380/avs.v20i4.43739>

Agradecimentos

Projeto CNPq nº 442870/2016-7 - Consórcio para o estudo da aplicabilidade, aprimoramento e disseminação nacional de métodos alternativos para a detecção da contaminação pirogênica em produtos para a saúde. Bolsa CNPq: Processo: 380135/2017-5 - Chamada MCTIC/CNPq Nº 19/2016 - Apoio às Atividades da Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA.

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.