

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Modelos *in vitro* para avaliação da
toxicidade pulmonar induzida por fármacos
e contaminantes**

Ana Lobo Mira da Costa

Monografia orientada pelo Professor Doutor Nuno Guerreiro de Oliveira,
Categoria Professor Catedrático

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2024

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Modelos *in vitro* para avaliação da
toxicidade pulmonar induzida por fármacos
e contaminantes**

Ana Lobo Mira da Costa

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pelo Professor Doutor Nuno Guerreiro de Oliveira,
Categoria Professor Catedrático

2024

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

Os pulmões estão em constante contacto com xenobióticos inalados ou absorvidos após outras vias de exposição. As exposições ocupacionais ou ocasionais a estes xenobióticos podem resultar em lesão aguda ou crónica do trato respiratório, com grande impacto na mortalidade e morbilidade a nível mundial. Diversos tipos de modelos celulares *in vitro* têm emergido como uma abordagem alternativa aos modelos animais, os quais por vezes se têm revelado fracos como preditores de toxicidade pulmonar, para além das implicações éticas decorrentes do seu uso. Os modelos pulmonares *in vitro* têm elevado interesse por permitirem a avaliação de efeitos tóxicos de xenobióticos inalados, assim como para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo também adequados para a caracterização dos mecanismos de toxicidade envolvidos. Este trabalho delimita os parâmetros importantes para o delineamento destes modelos, realçando as suas características, desafios e oportunidades.

Palavras-chave: “toxicidade pulmonar”; “avaliação *in vitro*” “modelos celulares alternativos”; “via inalatória”; “contaminantes ambientais”

Abstract

The lungs are in constant contact with xenobiotics inhaled or absorbed by other routes of exposure. Occupational or occasional exposure to these xenobiotics can result in acute or chronic respiratory injury, with a major impact on mortality and morbidity worldwide. Several types of *in vitro* cell models have emerged as an alternative approach to animal models, which have sometimes proven to be weak predictors of pulmonary toxicity, in addition to the ethical implications arising from their use. *In vitro* lung models have great interest because they allow the evaluation of toxic effects of inhaled xenobiotics as well as for the development of new drugs and are also suitable for characterization of toxicity mechanisms involved. This work delimits the important parameters for the design of these models, highlighting their characteristics, challenges and opportunities.

Keywords: “lung toxicity” “lung”, “*in vitro* assessment”; alternative cell models”; “inhalation route”; “environmental contaminants”.

Abreviaturas

ALI – *Air-liquid interface*

CP – Células primárias

CLCI – Células de linhas celulares imortalizadas

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

DPIF – Doença Pulmonar Induzida por Fármacos

ESC – *Embryonic Stem cell* (células estaminais embrionárias)

IC – Inibidores de *Checkpoints* imunológicos

IL – Interleucina

hPSC – *Human pluripotent stem cell*

iPSC – *Induced pluripotent stem cell*

ME – matriz extracelular

OMS – Organização Mundial de Saúde

PDMS - *Polydimethylsiloxane*

ROS – *reactive oxygen species*

Índice:

1	Introdução	8
2	Metodologia	10
3	Corpo de Revisão de Conjunto	11
3.1	Estrutura pulmonar.....	11
3.2	A exposição a xenobióticos por via inalatória	13
3.2.1	Mecanismos de Toxicidade Pulmonar	15
3.3	Modelos para avaliação da toxicidade <i>in vitro</i>	19
3.3.1	Tipos de células.....	20
3.3.2	Métodos.....	22
4	Conclusões e Perspetivas futuras	31
	Referências Bibliográficas	33
	Anexos	38
A1.	Biomarcadores e ensaios <i>in vitro</i> para avaliação da toxicidade pulmonar ..	38
A2.	Resumo das vantagens e desvantagens de diferentes tipos de células.....	40
A3.	Resumo das vantagens e desvantagens dos métodos <i>in vitro</i>	41

Índice de Figuras:

Figura 1 - Esquema da arquitetura pulmonar e respetivas células. Retirado da referência (15).....	11
Figura 2 – Locais de deposição de partículas (a) e gráfico da relação do local de deposição e diâmetro das partículas (b). Retirado da referência (16).....	14
Figura 3 Diagrama dos principais fatores de risco para a doença pulmonar induzida por fármacos. Adaptado de (7,8,21,23).....	16
Figura 4 – Enzimas metabolizadoras de fármacos expressas no pulmão humano. Retirado da referência (27).	18
Figura 5 - Células utilizadas em modelos pulmonares e a sua origem espacial. Retirado da referência (12).	21
Figura 6- Modelos biológicos do sistema respiratório humano, estando representados da menor à maior representatividade da fisiologia humana. Retirado da referência (30).....	22
Figura 7 – Progresso dos modelos <i>in vitro</i> . A: monocamada submersa, B: ALI, C: Cocultura, D: Modelos comerciais, E: Organoide, F: “Scaffolds”, G: Pulmão-em-chip, H: Bioimpressão 3D. Retirado da referência (14).....	23
Figura 8 -Representação das técnicas de bioimpressão 3D. a: “inkjet bioprinter”, b: microextrusão, c: bioimpressão assistida por laser. Retirado da referência (36). 27	27
Figura 9 - Modelo Pulmão-em-chip. Retirado da referência (39).	29

Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Tipos de células pulmonares e características	12
Tabela 2 - Classificação e características de contaminantes existentes no ar.....	13
Tabela 3 - Potenciais mecanismos de lesão pulmonar induzida por fármacos	16

1 Introdução

Os pulmões encontram-se em constante exposição a xenobióticos solúveis inalados ou transportados pelo sangue. A exposição ocupacional, prolongada ou ocasional a diferentes xenobióticos pode resultar em lesão aguda ou crónica de células do trato respiratório. As células epiteliais brônquicas e alveolares são locais importantes do metabolismo dos xenobióticos, estando por isso mais suscetíveis à toxicidade induzida por estes produtos exógenos.(1,2)

Recentes dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que 99% da população mundial respira ar que excede os limites da “WHO Global Air Quality Guidelines”, contendo um elevado número de poluentes.(3,4)

As doenças respiratórias surgem entre as 10 principais causas de morte a nível mundial, responsáveis por mais de 8 milhões de mortes por ano, segundo dados de 2000 a 2021, publicados pela OMS em 2024. Cerca de 200 milhões de pessoas (4% da população mundial) tem DPOC e esta mata 3,2 milhões por ano. O cancro do pulmão é a neoplasia maligna mais diagnosticada e com baixa taxa de sobrevivência (especialmente em estadios de doença avançados), matando cerca de 1,8 milhões de pessoas anualmente.(3–5)

Ainda segundo a OMS, existem mais de 1,3 mil milhões de fumadores de tabaco no mundo, criando um incontável tabagismo passivo. Dados de 2019 indicam que 19,3% dos europeus com mais de 15 anos eram fumadores diários de produtos de tabaco, sendo este o maior contribuinte para DPOC e desenvolvimento de asma em adultos e crianças.(3,4)

Para além de contaminantes ambientais, denota-se um crescente reporte de doença respiratória induzida por fármacos (DRIP), sendo os grupos farmacológicos mais associados a esta toxicidade: antineoplásicos, inibidores de “checkpoints” imunológicos (ICI), antiarrítmicos, antibióticos, anti-inflamatórios, medicamentos antirreumáticos modificadores de doença. Em estudos coorte de doentes com Doença Pulmonar Intersticial, 3 a 5% estão relatados como reação adversa de fármacos. Estes valores traduzem-se em cerca de 4,1 a 12,4 casos/ milhão de habitantes. Esta incidência estará subestimada devido à dificuldade de confirmação de diagnóstico.(4,6–8)

Mais de 1300 substâncias estão descritas no site www.pneumotox.com, uma base de dados atualizada e extensiva de fármacos e/ou procedimentos que demonstraram ou sugerem ser responsáveis por dano pulmonar. Este número de substâncias tende a aumentar com o aparecimento e desenvolvimento de novos fármacos e os possíveis efeitos adversos inerentes à sua utilização.(3,5)

Todos estes números estatísticos mostram a real necessidade de modelos de avaliação de toxicidade pulmonar, com especial ênfase em modelos *in vitro* em detrimento dos modelos animais (*in vivo*), devido às diferenças genéticas, anatómicas e fisiológicas que os tornam maus preditores de resposta à toxicidade em humanos.(9,10)

Várias organizações promovem o desenvolvimento de alternativas à experimentação animal, como a EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM), tendo por base os Princípios dos 3Rs (“reduce”, “refine” e/ou “replace”).(11–13)

Esta revisão pretende sistematizar os principais modelos *in vitro* usados para investigar a toxicidade pulmonar, discutindo diferentes abordagens para estudar os efeitos de fármacos e contaminantes ambientais.

2 Metodologia

Esta monografia foi elaborada através de um processo de revisão de literatura e seleção de artigos com maior relevância científica na área. Numa fase preliminar foi efetuada uma pesquisa na base de dados PubMed, entre março e maio de 2024, com recurso aos descritores: “in vitro”, “pulmonar”, “lung”, “model”, “human”, “drug”, “toxicity”, “drug-induced”, bem como à combinação dos mesmos. Esta fase permitiu delimitar a pesquisa, tendo sido efetuada uma primeira leitura para a seleção dos artigos mais pertinentes. Posteriormente foi feita uma análise dos artigos referenciados nos textos encontrados, para uma compreensão mais abrangente do estado de arte.

3 Corpo de Revisão de Conjunto

3.1 Estrutura pulmonar

Os pulmões são os principais órgãos do sistema respiratório responsáveis pelas trocas gasosas, pela oxigenação do sangue e eliminação de dióxido de carbono produzido no organismo.(5,11)

O trato respiratório apresenta três regiões diferentes: nasal/traqueal/faringeal (traqueia e brônquios), vias aéreas superiores (vias condutoras sem trocas gasosa – bronquíolos) e as vias aéreas inferiores (vias respiratórias e de trocas gasosas – alvéolos), esquematizadas na Figura 1.(14)

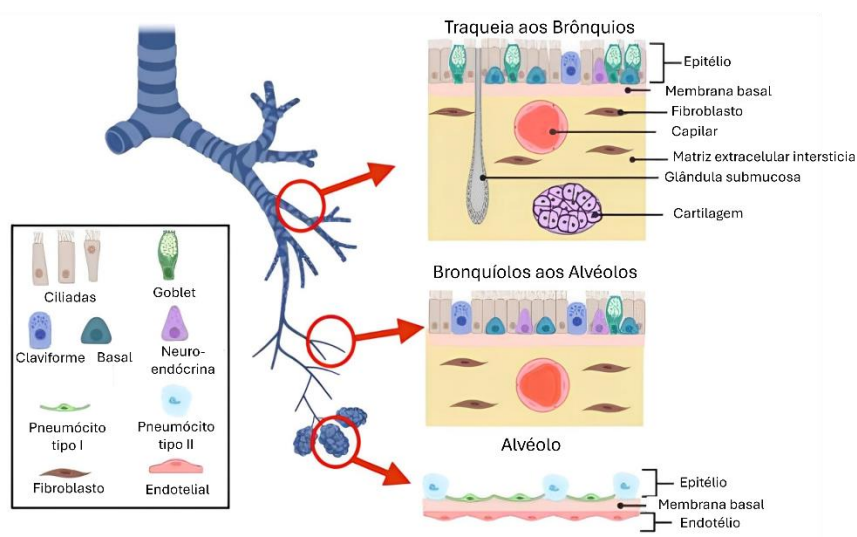


Figura 1 - Esquema da arquitetura pulmonar e respectivas células. Retirado da referência (15).

Num ensaio recente de sequenciação de mRNA foram identificadas 58 populações de células no pulmão humano, entre as quais se destacam as células epiteliais e endoteliais, células do sistema imunitário (como macrófagos alveolares) e elementos do mesênquima pulmonar (vias aéreas e músculo liso, perícito e fibroblastos). As principais células estão caracterizadas na Tabela 1.(5)

Tabela 1 - Tipos de células pulmonares e características

Células	Características
Ciliadas	Tipo de células mais comum; Possuem mais de 200 cílios na zona apical que ajudam a remover muco e partículas inaladas para fora das vias respiratórias através do batimento mucociliar.
Goblet ou caliciformes	Secretam muco que lubrifica e protege o epitélio.
Basais	Protegem o estroma do ambiente externo; Consideradas células estaminais que se podem diferenciar noutros tipos de células do epitélio, desempenhando um papel importante na regeneração de tecido.
Neuroendócrinas	Responsáveis por controlar o crescimento de outras células pulmonares, controlo do fluxo de ar e sanguíneo.
Claviformes	Produção de proteínas, antiproteases, moléculas essenciais para a defesa do tecido pulmonar.
Pneumócitos tipo I	Escamosas, com citoplasma fino; Facilitam trocas gasosas e passagem de pequenas moléculas.
Pneumócitos tipo II	Mais frequentes que células tipo I; Produção de surfactante; Progenitores das células tipo I.
Macrófagos alveolares	Primeiras células que contactam com antigénios inalados (agentes infecciosos, alergénios e partículas); Importantes na regulação de resposta imune e inflamação no pulmão.

Adaptado de (5,14,16)

O pulmão apresenta grande heterogeneidade na estrutura e função, fundamentais para a manutenção da barreira fisiológica que separa o ar dos alvéolos do sangue dos capilares pulmonares.(5) A polaridade apical-basolateral das células epiteliais e a sua morfologia adequada garantem a integridade e manutenção desta barreira através de diversos mecanismos como a produção de surfactante que reduz a tensão superficial nos alvéolos e previne o seu colapso, movimento ciliar, junções estreitas entre células que limitam a permeabilidade a substâncias e presença de células imunológicas que protegem contra agentes externos.(14,17)

Os pulmões são um alvo eminente para diversos danos induzidos por xenobióticos inalados ou pela administração sistêmica, que podem comprometer a integridade da barreira, alterando a função pulmonar e contribuindo para o desenvolvimento de doença respiratória.(2,18)

3.2 A exposição a xenobióticos por via inalatória

Geralmente usados para fins industriais, agrícolas e domésticos diversos xenobióticos podem ser encontrados no ar, solo, água, plantas, animais e humanos devido à incapacidade de se degradarem. O impacto da sua exposição tanto para os seres humanos como para o ambiente não deve ser negligenciado, na medida em que mesmo a concentrações extremamente baixas, uma exposição prolongada pode ter efeitos tóxicos, mutagénicos e teratogénicos.(2,19) A presença destes compostos no ar pode resultar numa exposição direta ao sistema respiratório, constituindo um risco para a saúde humana. Muitos destes compostos podem ser encontrados sob diversas formas tais como indicadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação e características de contaminantes existentes no ar.

Contaminante	Características	Exemplos
Gases	Toxicidade depende da solubilidade, difusibilidade, reatividade do tecido e frequência respiratória.	SO ₂ , NO ₂ , O ₃ , CO, H ₂ S
Vapores	Forma gasosa de uma substância que também pode existir como líquido ou sólido à pressão atmosférica e temperatura normal.	Benzeno, Formaldeído, Naftaleno, hidrocarbonetos
Aerossóis/ Partículas	Sólidos ou líquidos dispersos num gás; Locais de deposição dependente do tamanho das partículas; Classificados de acordo com tamanho: poeiras, fumos, fumo, névoas, nevoeiro e smog.	Fumo de tabaco, veículos de combustão

A deposição de partículas na mucosa das vias aéreas ocorre pela combinação de forças aerodinâmicas e características das partículas. Estas constituem um risco para a toxicidade humana pela possibilidade de serem inaladas, e são classificadas de acordo com o seu diâmetro aerodinâmico: $<10\mu\text{m}$ (PM_{10}), $<2,5\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$). (12,16)

A deposição das partículas ocorre por impacto, intercepção, sedimentação, difusão e deposição eletrostática, tal como esquematizado na Figura 2a. Esta ocorre em diferentes locais do trato respiratório, dependendo do seu diâmetro (Figura 2b).(9,16)

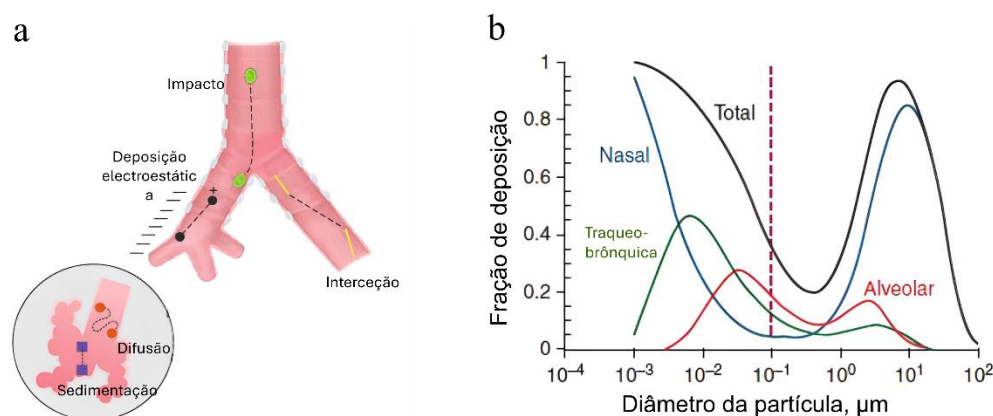


Figura 2 – Locais de deposição de partículas (a) e gráfico da relação do local de deposição e diâmetro das partículas (b). Retirado da referência (16).

A impacto ocorre no nariz, faringe, traqueia e brônquios maiores, onde o fluxo de ar é rápido e sofre variadas mudanças de direção devido à arquitetura das vias aéreas. Partículas maiores e mais pesadas acabam por impactar na superfície da mucosa, ficando presas no muco e removidas pela depuração mucociliar que impulsiona o muco em direção à glote.(16) A intercepção ocorre principalmente nas vias aéreas menores e depende da conformação das partículas. Partículas de forma alongada ou sob a forma de fibras seguem o fluxo de ar, mas devido ao seu comprimento são interceptadas em zonas de bifurcação ou ramificação das vias aéreas.(16)

A sedimentação ocorre nos locais mais distais do pulmão (alvéolos). Nestas vias aéreas de menor diâmetro a velocidade de fluxo de ar é baixa, e as partículas ($1-5\mu\text{m}$) sofrem ação da gravidade, depositando-se. A sedimentação está ainda dependente do tempo em que a partícula se encontra neste espaço e, portanto, dependente do ciclo respiratório. As partículas depositadas nesta região são removidas por células especializadas, i.e. macrófagos alveolares.(9,16)

A difusão processa-se para partículas de dimensões $\leq 100\text{nm}$ (nanopartículas) que estão sujeitas a movimento Browniano, movimento aleatório devido a colisões entre estas e as moléculas do meio em que estão suspensas, sendo que quanto menor a sua massa, mais sujeitas estão a este processo.(16)

A deposição eletrostática é um mecanismo que ocorre para partículas carregadas positivamente que são atraídas pela superfície das vias aéreas que é carregada negativamente.(16) Para além de partículas inaladas, existe ainda compostos administrados sistemicamente que chegam ao pulmão pela circulação pulmonar podendo causar toxicidade e lesão local.(16) A extensão da lesão está dependente do agente reativo e da sua concentração, forma de exposição, existência de vias de desintoxicação e de biotransformação, e da afinidade deste às células-alvo.(2)

A lesão pulmonar induzida por fármacos envolve as vias respiratórias, parênquima pulmonar, mediastino, pleura, vasculatura pulmonar e/ou o sistema neuromuscular.(20)

3.2.1 Mecanismos de Toxicidade Pulmonar

Apesar dos efeitos pulmonares originados por xenobióticos, não são ainda claros os mecanismos de dano, desenvolvimento e regulação de doença.(1,18)

Os mecanismos parecem sobrepor-se e interligar-se, sendo difícil entender a fisiopatologia de lesão. Alguns mecanismos de toxicidade induzida por fármacos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Potenciais mecanismos de lesão pulmonar induzida por fármacos

Mecanismo	Exemplos
Toxicidade direta na célula (apoptose)	Bleomicina, quimioterápicos, O ₃ , ácido clorídrico
Deposição intracelular de fosfolípidos	Amiodarona
Produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), com alteração do balanço Oxidante/Antioxidante; Toxicidade potenciada por administração de oxigénio concomitante	Agente alquilantes, Bleomicina, Nitrofurantoína, Paraquato
Toxicidade através da biotransformação com produção de metabolitos quimicamente mais reativos e instáveis	Amiodarona
Antigenicidade levando a uma toxicidade pulmonar imunomediada (haptenos). Sensibilização prévia necessária	Hipersensibilidade induzida por metotrexato
Desregulação do sistema imunitário por efeito biológico direto do fármaco ou como adjuvante indutor de distúrbio imunitário	ICI, Interferão- α , Amianto

Adaptado de (21,22)

Para além de a toxicidade pulmonar estar dependente do agente, dosagem, duração de exposição, existem ainda fatores de suscetibilidade do doente, tal como indicado na Figura 3.



Figura 3 Diagrama dos principais fatores de risco para a doença pulmonar induzida por fármacos. Adaptado de (7,8,21,23).

Relativamente a mecanismos de toxicidade diretos, estes resultam tal como o nome indica da interação direta do agente com o seu alvo celular, principalmente células epiteliais e endoteliais de bronquíolos e alvéolos. Pode ser devida a um efeito citotóxico (por interação com membranas e/ou organelos celulares), causando necrose ou apoptose celular, sem a mediação do sistema imunológico ou de metabolitos secundários.(22,24)

Fármacos como amiodarona, um composto altamente lipofílico, apresentam grande afinidade para pneumócitos tipo II (produtoras de surfactante pulmonar), células do parênquima pulmonar, células endoteliais e fibroblastos, levando a uma acumulação anormal de fosfolípidos dentro das células, um processo denominado de fosfolipidose.(25,26)

A toxicidade pulmonar da bleomicina está relacionada com a alta afinidade do fármaco aos pulmões, e com a acumulação deste nos tecidos pulmonares devido à baixa atividade de hidrolases que o degradam. A toxicidade é induzida por um complexo bleomicina-ferro que promove a formação excessiva de ROS. Quando comparado com outros tecidos, o tecido pulmonar é particularmente suscetível à formação destas espécies reativas devido à constante exposição ao oxigénio, e à menor capacidade de neutralizar radicais. Como resultado pode ocorrer a lesão do DNA, designadamente a formação de quebras nesta macro molécula e podem ocorrer danos nas membranas e proteínas.(16,22,24,26)

Por outro lado, a bioativação metabólica é um processo muito importante no contexto da Toxicidade pulmonar e surge no decurso do metabolismo dos xenobióticos. A biotransformação tem por finalidade facilitar a eliminação de substâncias lipofílicas que, de outra forma se acumulariam no organismo, nomeadamente nos lípidos celulares. Este procedimento é conseguido através de um conjunto muito vasto de enzimas com capacidade de introduzir novos grupos funcionais mais polares e reativos na molécula (reações de Fase I, funcionalização), seguido da conjugação com moléculas endógenas como o ácido glucorónico, glutathiona, sulfato e aminoácidos, para aumentar a sua hidrofília (reações de Fase II), tal como representado na Figura 4.(27)

Apesar de o metabolismo hepático ser predominante, os pulmões contêm igualmente enzimas responsáveis pela metabolização de xenobióticos. Existem dados extensos de mRNA de enzimas metabolizadoras de xenobióticos nos pulmões, com perfil

enzimático variável e indutor de toxicidade específica das células: quanto maior a expressão destas enzimas, maior a probabilidade de lesão nessas células. As células com significativa expressão de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, e portanto mais suscetíveis a lesão são as células basais, ciliadas, pneumócitos tipo I e tipo II, macrófagos e endoteliais vasculares. (27)

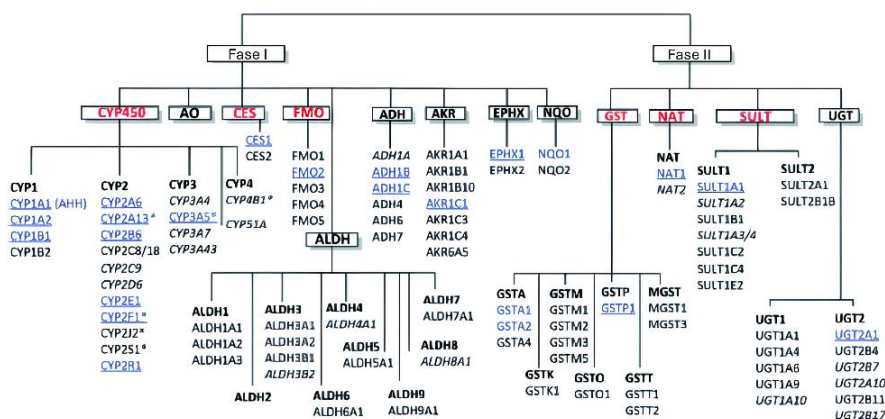


Figura 4 – Enzimas metabolizadoras de fármacos expressas no pulmão humano. Retirado da referência (27).

As reações de biotransformação são, na generalidade, benéficas para eliminação de xenobiótico, embora em alguns casos resulta em metabolitos intermédios mais reativos e instáveis, através de um processo denominado em Toxicologia por bioativação metabólica. A bioativação resulta na formação de espécies eletrofílicas que reagem com biomoléculas celulares, modificando-as ou formando aductos.(27) Muitos dos compostos que provocam lesão pulmonar não têm características intrínsecas de pneumotoxicidade, atuando após ativação, provocando subsequentemente lesões nas células-alvo.(21)

Existem também mecanismos relevantes de toxicidade imunomediada no contexto da Toxicologia respiratória. Um exemplo relevante é o metotrexato que está associado a reações de hipersensibilidade pulmonar, em que o fármaco é reconhecido pelo sistema imunológico como “estranho” (antigénio ou hapteno), desencadeando uma resposta imunológica exagerada com ativação de linfócitos T e B, e libertação de citocinas. Estas reações requerem uma sensibilização prévia pelo fármaco e não apresentam relação direta dose-resposta.(20,24,28)

Por outro lado, alguns fármacos atuam desregulando o sistema imunológico, podendo atuar como adjuvantes da sua modulação, ativando-o de forma intensa, e podendo levar inclusivamente a uma resposta inflamatória ou autoimune.(16,20,24)

Para avaliação de toxicidade de fármacos e outras substâncias, têm sido historicamente usados modelos animais, sendo essenciais para estudos *in vivo*, e no desenvolvimento de estudos pré-clínicos.(9,29) Apesar da sua utilização sistemática, estes modelos têm mostrado fragilidades na predição do sucesso clínico e da segurança de fármacos devido a diferenças inter-espécies relevantes a nível estrutural (e.g. o rato não tem bronquíolos), funcional (o rato tem respiração exclusivamente nasal), e também nos próprios mecanismos de ação envolvidos (perfil enzimático diferente entre animais e humanos).(16,30) Essas limitações traduzem-se, por exemplo, numa capacidade insuficiente de mimetizar a complexa fisiologia e progressão da carcinogénese humana, sendo que menos de 8% dos ensaios pré-clínicos são traduzidos para ensaios clínicos.(5)

As limitações dos modelos animais demonstram que este não é um modelo perfeito para avaliação de patogénese de doença pulmonar ou desenvolvimento de fármacos. São assim necessários modelos preditivos da toxicidade em pulmões humanos que visem representar as condições de exposição e fisiopatológicas mais próximas do pulmão nativo, como os modelos *in vitro*. (31)

3.3 Modelos para avaliação da toxicidade *in vitro*

Devem possuir características que mimetizem com precisão o microambiente pulmonar, e satisfaçam os objetivos propostos para cada estudo.(5,32) Para validar um método *in vitro* é essencial ter em conta: tipo de células representativas (epiteliais, endoteliais) e a sua origem celular, comunicação e interações celulares, o sistema de cultura (substrato e tipo de fluxo, dimensionalidade, fluxo de ar, forças mecânicas) e material de suporte (viscoelasticidade, deformabilidade e porosidade).(5,11)

Os efeitos tóxicos de substâncias no tecido pulmonar em modelos *in vitro* são identificados por ensaios de indicadores específicos (Anexo 1) que avaliam a viabilidade, crescimento, e morte celular, atividade metabólica, genotoxicidade, epigeneticidade e produção de mediadores inflamatórios.(1,9) A combinação adequada de todos esses fatores permitirá simular melhor a biologia dos pulmões humanos.

3.3.1 Tipos de células

A escolha do tipo de células está dependente do objetivo do estudo *in vitro*, e podem ser classificadas de acordo com a sua origem. As vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de células encontram-se esquematizadas no Anexo 2.

Linhas celulares imortalizadas. As células de linhas celulares imortalizadas (CLCI) são frequentemente usadas em estudos *in vitro* devido à sua fácil acessibilidade, baixo custo, baixa variabilidade, fornecimento ilimitado e escalabilidade.(18) A sua obtenção pode ser de duas formas: a partir de tecidos tumorais (como adenocarcinoma) ou por transformação viral de células primárias, sendo que em ambos os casos há desregulação dos mecanismos de senescência natural, permitindo uma vida útil prolongada, ideais para “highthroughput screening”.(9,11)

As maiores desvantagens da utilização de CLCI são a baixa representatividade (existe apenas um dador), e o perfil genético e epigenético difere das células *in vivo*. (9,11)

Células primárias (CP). Estas células são obtidas diretamente do tecido de dadores humanos, através de biópsias ou ressecções cirúrgicas de tecido pulmonar, pulmões de cadáveres ou lavagens brônquio-alveolares. Estas respondem de forma semelhante às células *in vivo*, quando comparadas com as CLCI. No entanto, ao longo de sucessivas passagens de cultura, as CP perdem características fenotípicas (levando em último caso a senescência). (5,9,18) A difícil obtenção de CP, associada à grande heterogeneidade de células obtidas entre dadores, impede que estes modelos permitam a reprodutibilidade de resultados e a representatividade para uma população.(5,9)

As CP e CLCI são amplamente utilizadas em modelos pulmonares (Figura 5) e apresentam grandes diferenças, refletidas num estudo comparativo entre linhagens tumorais (A549 e Calu-3), transformadas (BEAS-2B e Met-5A) e as equivalentes CP. Observou-se que células brônquicas proliferam mais rapidamente que as células mesoteliais, e que as células tumorais apresentam a maior taxa de proliferação. As CP e células tumorais apresentam maior atividade metabólica, sendo que as CP apresentam um perfil inflamatório mais estável (menor expressão de IL-6 e atividade glutatona reductase). As CP respondem ao stress oxidativo de forma mais pronunciada que as

restantes células, e as células tumorais (A549 e Calu-3) estão maioritariamente em distribuição ciclo celular G2/M.(33,34)

Estes dados demonstram a importância da escolha das células para modelos *in vitro* pela possibilidade de viés na leitura e sistematização de dados de diversos estudos.

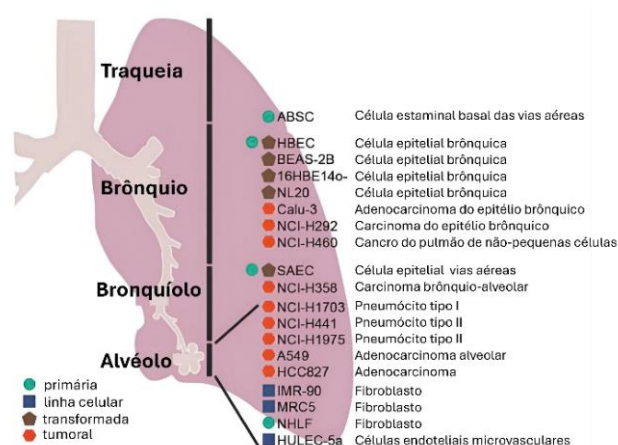


Figura 5 - Células utilizadas em modelos pulmonares e a sua origem espacial. Retirado da referência (12).

Células estaminais. Para contornar a difícil acessibilidade a tecido pulmonar humano, vários grupos têm trabalhado para a criação de uma fonte renovável de células, como as células estaminais pluripotentes humanas (hPSC). Estas são uma fonte autóloga, com alta capacidade de diferenciação, estabilidade fenotípica, representatividade e reprodutibilidade de ensaios.(5,13,31)

As células estaminais pluripotentes embrionárias (ESC) têm capacidade de gerar todas as 3 camadas germinativas do blastócito e, como tal, capacidade de se diferenciar em todas as células do tecido humano. No entanto, o isolamento destas células implica a destruição de embriões humanos, o que acarreta questões éticas que limitam a utilização deste tipo de células.(5,11) Por outro lado, as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) despertam maior interesse por terem na sua génese células somáticas que são reprogramadas através de fatores de diferenciação, para adquirirem capacidade multipotente. As hPSC têm capacidade de se diferenciarem noutros tipos de células existentes nos pulmões, através de sinais bioquímicos exógenos que atuam como diferenciadores celulares para o desenvolvimento pulmonar (incluindo especificação próximo-distal). No entanto, diversos estudos têm referido como maior desvantagem a sua imaturidade celular e insuficiente diferenciação.(5,11,31)

3.3.2 Métodos

Na Figura 6 estão representados os modelos respiratórios mais comuns representativos da fisiologia humana.

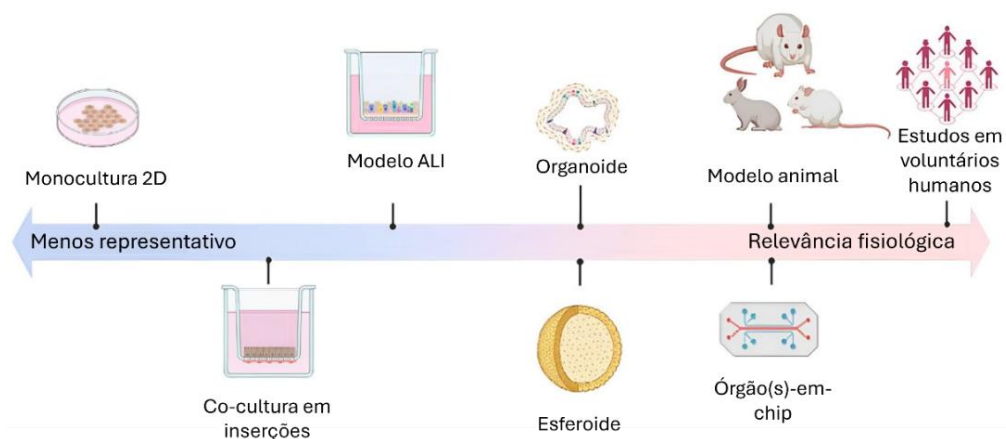


Figura 6- Modelos biológicos do sistema respiratório humano, estando representados da menor à maior representatividade da fisiologia humana. Retirado da referência (30).

O primeiro método *in vitro* como alternativa ao modelo animal para estudo da fisiopatologia tecidual e resposta a fármacos foi a cultura de células em monocamada.(18,31)

Com o objetivo de melhorar a relevância e precisão dos estudos *in vitro*, têm sido desenvolvidos diferentes métodos (resumo das vantagens e desvantagens de cada método no Anexo 3) representados na Figura 7, que podem ser classificados de acordo com a dimensionalidade do sistema.(35)

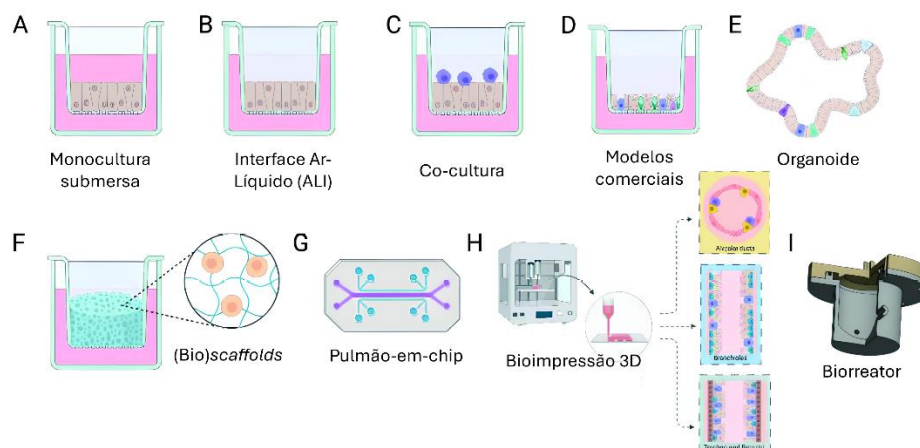


Figura 7 – Progresso dos modelos *in vitro*. A: monocamada submersa, B: ALI, C: Co-cultura, D: Modelos comerciais, E: Organoide, F: “Scaffolds”, G: Pulmão-em-chip, H: Bioimpressão 3D. Retirado da referência (14).

Bidimensionais (2D)

Monocamada. Este método tradicional consiste num sistema simples, de abordagem estática, em que as células (em mono ou co-cultura) são cultivadas numa camada, em placas ou inserções de *transwell* submersos num líquido rico em nutrientes (Figura 7A).(5,11,18)

É amplamente usado para investigar anormalidades funcionais e estruturais de células ciliadas, ajudando a compreender o seu papel fulcral na eliminação de partículas, e no diagnóstico de doenças associadas como a discinesia ciliar primária, fibrose quística, DPOC e asma.(14,18)

Este modelo permite estudos em larga escala, com fornecimento de dados em tempo real, de interpretação simples e comparação direta de resultados.(5,31)

O facto de as células estarem submersas, sem contacto com o ar atmosférico, resulta num comportamento fisiológico pouco relevante, com proliferação anormal, taxas e perfis de expressão génica e proteica diferentes dos observados *in vivo*. A incapacidade de se diferenciarem de forma adequada e completa, pela inaptidão de gerar células ciliadas, impede a formação de uma barreira funcional.(5)

Modelo Interface Ar-Líquido. O desenvolvimento do modelo interface ar-líquido (ALI) demonstrou ser um avanço para simular a estrutura e funções do epitélio pulmonar, em que as células são cultivadas num filtro poroso que separa fisicamente o tecido epitelial do meio circundante, permitindo que a superfície celular interaja com o ar atmosférico, enquanto a superfície basolateral comunica com o meio de cultura (Figura 7B).(9,17,18)

Os primeiros sistemas demonstraram que células brônquicas cultivadas deste modo, além de formarem cílios maduros, aumentaram a secreção de muco, contrastando com as culturas submersas sem sinais de ciliogênese ou produção de muco.(14)

Estes modelos recapitulam o padrão das células epiteliais *in vivo* descrito em estudos morfológicos e de expressão gênica, destacando-se pela possibilidade de co-cultura (cultivo de diferentes tipos de células na zona apical e basolateral). Como alguns exemplos podemos referir as células epiteliais com macrófagos para estudar a interação do epitélio com o sistema imunitário inato; células epiteliais e fibroblastos para estudar o papel destes na reparação e regeneração de epitélio após lesão; células epiteliais e as células dendríticas para estudar a resposta imunológica (Figura 7C).(14,17,18)

Atualmente, estão comercializados modelos extensivamente utilizados para modelação de doença, descoberta de fármacos e estudo de toxicidade (Figura 7D). Apresentam vantagens para avaliação de toxicidade de substâncias inaladas, pela possibilidade de controlar a temperatura, humidade e fluxo de ar importantes na aerodinâmica e deposição de partículas.(9,14)

Tridimensionais.

Apesar de as culturas 2D estudarem a comunicação célula-célula, carecem de organização espacial, com interações célula-célula e célula-matriz extracelular (ME), oferecendo uma proximidade fisiológica aos métodos *in vivo*.(32)

a) Esferoides e organoides. Não existe consenso para a definição dos termos esferoide e organoide, sendo que compartilham algumas propriedades, mas a diferença essencial reside no nível de complexidade e organização estrutural.(11,17)

Os esferoides são agregados simples de células em modelo de cultura em suspensão em biorreatores ou em suporte tridimensional (hidrogéis naturais ou sintéticos). São obtidos

a partir de CLCI, CP ou tecidos, sendo incapazes de auto-renovação e diferenciação celular. Estas estruturas são adequadas para o estudo de fármacos para tumores sólidos devido à sua capacidade de reproduzir características como: heterogeneidade celular, sinalização célula-célula, estrutura interna, expressão génica e resistência a medicamentos.(5,12,32)

Organoides são estruturas compostas por diferentes tipos de células, com potencial de diferenciação e auto-renovação, sendo capazes de mimetizar alguns níveis de função e disposição espacial do órgão-alvo nativo tais como secreção de surfactante, eliminação de partículas e proteção contra agentes infecciosos microbianos. Essencialmente, têm sido usados para estudos funcionais de células estaminais que, devido à sua capacidade de propagação, podem ser mantidas em cultura durante vários meses.

A sua génese a partir de iPSC permite observar mecanismos que ocorrem no desenvolvimento embrionário, mimetizando as cascatas de sinalização e processos durante a organogénese. É possível a obtenção de “mini órgãos” em diferentes estádios de desenvolvimento, originários de múltiplas camadas germinativas e com variada diferenciação e composição celular.(Figura 7E). (5,11,31)

Por outro lado, derivados de células estaminais adultas são representativos dos mecanismos de reparação de tecido adulto, fundamentalmente os de natureza epitelial, sem elementos estromais, nervosos ou vasculares na sua composição.(31)

A capacidade de expansão e estabilidade genómica torna estes modelos apropriados e promissores para formação de biobancos, estudos “high-throughput drug screening”, estudos interação microrganismo-hospedeiro e modelação de doença (pela replicação do fenótipo de doença *in vitro*). (5,12)

As desvantagens deste sistema comparativamente com as culturas 2D são o seu elevado custo e não serem diretamente aplicáveis ao estudo da exposição por inalação, onde ganham maior destaque as culturas ALI por não apresentarem desafios da estrutura 3D. (5)

Nos modelos anteriormente descritos, apenas uma fração das células está em contacto com outras células e ME, enquanto a restante fração está exposta ao meio de cultura. *In vivo*, há gradientes espaciais que influenciam a polarização, migração e diferenciação celular.(14)

b) “Scaffolds”. Por forma a recriar o macro e micro ambiente pulmonar, têm sido desenvolvidos suportes que mimetizem a arquitetura nativa pulmonar.(5)

A ME pode ser obtida a partir de pulmões inteiros, ressecções ou fragmentos pulmonares submetidos a protocolos “detergent-based” que retiram todos os componentes celulares destes tecidos, mantendo uma estrutura ramificada tridimensional das vias respiratórias e alvéolos, assim como a organização vascular, representado na Figura 7F.(5)

Posteriormente, as matrizes descelularizadas podem ser recelularizadas com células endoteliais, epiteliais e/ou estromais cultivadas dinamicamente, recapitulando importantes processos fisiológicos pulmonares, como a perfusão vascular. (5,18)

Após estes processos, a composição química da ME pode estar alterada pela perda de elastina e glucosaminoglicanos, essenciais para manter a integridade estrutural e propriedades mecânicas do pulmão. Estes protocolos são complexos e demorados, e a remoção antigénica é incompleta podendo provocar respostas imunológicas que comprometem a fiabilidade de resultados.(5,32)

A problemática fulcral, que é transversal a métodos anteriormente referidos, prende-se com a disponibilidade de material pulmonar humano para o estudo. Considerando que os pulmões de doadores saudáveis são reservados a transplantes, apenas os não adequados para transplantes podem ser usados; e o mesmo ocorre nos processos cirúrgicos, em que apenas é removido o tecido doente.(5)

Em todo o caso, vários relatórios apontam que pulmões saudáveis envelhecidos ou doentes respondem de forma diferente aos protocolos de descelularização, revelando-se um potencial modelo de estudo para a fisiopatologia pulmonar.(18,32)

Assim, torna-se necessário encontrar biomateriais para formar estruturas similares, nas quais as células pulmonares são semeadas, diferenciadas e mantidas. Os materiais naturais como o colagénio e gelatina são biocompatíveis, permitem a adesão e fixação celular, e a sua decomposição é similar aos processos que ocorrem fisiologicamente. Por outro lado, apresentam variabilidade entre lotes, difícil reprodutibilidade e limitações mecânicas.(5)

Por outro lado, os polímeros sintéticos, de que são exemplos o poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e ácido poli(lacticooglicólico) (PLGA) e o hidrogel, apresentam características viscoelásticas que mimetizam as propriedades mecânicas *in vivo*.(5,14)

Estes “scaffolds” artificiais são fabricados por técnica de eletrofiação, na qual há formação de micro/nano fibras com um ajuste fino da porosidade do material (permitindo a passagem de nutrientes, gases), alteração da superfície e taxa de degradação. A considerável área de superfície proporciona o crescimento celular nestas estruturas.(5,12)

c) Bioimpressão 3D. Ao contrário do modelo “scaffold”, em que as células são semeadas numa estrutura pré-existente, na Bioimpressão 3D as células são organizadas e depositadas durante a impressão, como demonstrado na Figura 7H e Figura 8.

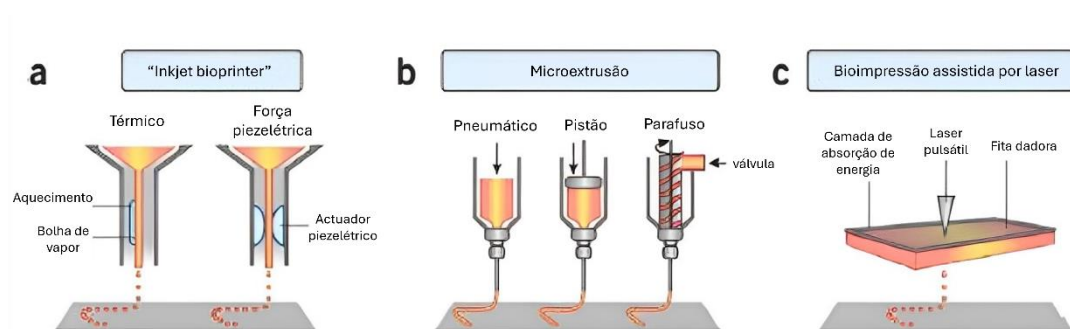


Figura 8 -Representação das técnicas de bioimpressão 3D. a: “inkjet bioprinter”, b: microextrusão, c: bioimpressão assistida por laser. Retirado da referência (36).

Esta tecnologia de produção baseia-se nos processos usados por impressoras 3D convencionais, que depositam biotintas (compostas por células e biomateriais), camada a camada, construindo uma estrutura que é direcionada e previamente desenhada por software específico. Para a bioimpressão existem diferentes técnicas com diferentes funcionalidades.(32,36)

“Inkjet bioprinting” funciona de forma semelhante às impressoras a jato de tinta convencionais, em que o cartucho contém as células suspensas numa solução, e as gotas são geradas a partir de uma cabeça de impressão controlada por um manipulador de temperatura ou por força piezométrica, representado na Figura 7a. Esta técnica é relativamente rápida e acessível, permitindo a deposição camada-a-camada de diferentes tipos de células, criando estruturas que mimetizam a arquitetura do tecido pulmonar com relativa precisão.(36,37)

Microextrusão é uma técnica na qual a biotinta é forçada por uma extrusora mecânica que produz um fluxo contínuo a partir da cabeça de um microbucal (Figura 7b). São

produzidos filamentos de diâmetro muito reduzido permitindo uma maior precisão no fabrico de microestruturas complexas e detalhadas, como capilares. Em oposição ao “inkjet bioprinting”, o processo é mais moroso e pode ser usada biotinta de alta viscosidade. Uma particularidade a ter em conta é que quanto maior a pressão para extrusão do material, menor é a viabilidade celular.(5,36–38)

A bioimpressão assistida por laser é a melhor forma para obter tecidos de alta resolução e precisão, conseguindo alcançar uma resolução uniforme de uma célula por gota. Esta técnica consiste numa fonte de laser pulsátil que incide sobre uma fita dadora (composta por uma camada de vidro que filtra radiação num determinado comprimento de onda, uma camada de metal que absorve energia e uma camada de biotinta, esquematizadas na Figura 7c), gerando pressão que “empurra” uma gotícula de biotinta que se deposita no substrato até formar uma estrutura 3D. O calor do laser pode afetar adversamente a viabilidade celular. É a técnica mais lenta e demorada, essencialmente devido ao processo de produção da fita e custo mais elevado, sendo por isso a menos adequada para grandes volumes de tecido.(36,37)

Diferente dos anteriores métodos de bioimpressão, na Bioestereolitografia a biotinta não é expelida ou libertada por uma agulha ou bico extrusor, é moldada.(38)

A impressão ocorre por fotopolimerização, ou seja, quando um feixe de laser ou luz ultravioleta é projetado de forma controlada sobre a superfície da biotinta, esta solidifica.(36–38)

Esta técnica permite uma alta resolução, precisão para construir estruturas finas e complexas, e com menor stress celular, uma vez que as células não têm de sofrer forças mecânicas ou efeito da temperatura. Contudo, a exposição à luz ultravioleta pode causar inviabilidade celular, dependendo da intensidade e exposição. Por esta razão, nem todos os biomateriais podem ser usados por este método (especialmente se sensíveis à luz UV).(37)

Na verdade, até à data ainda não foi possível replicar na totalidade a geometria pulmonar nativa através de qualquer técnica de bioimpressão e, apesar das melhorias da replicação estrutural e funcional, ainda existem desafios na replicação de forças mecânicas e perfusão hemodinâmica.(5)

d) Pulmão-em-chip

O órgão-em-chip, consiste num dispositivo composto por microcanais continuamente perfundidos e revestidos por células vivas, recriando o estado complexo e dinâmico das células no órgão nativo: interface tecido-tecido, forças mecânicas, fluxo de fluidos, células imunológicas e gradientes bioquímicos que são críticos em situação saudável ou de doença.(5,31)

Estes modelos já foram desenvolvidos para diversos órgãos como intestino, fígado, músculo, barreira hematoencefálica, rim e pele. No entanto, os modelos de pulmões estão subdesenvolvidos comparativamente com outros órgãos devido à sua complexa geometria e heterogeneidade de células que compõem o microambiente de interface ar-líquido pulmonar.(5)

O primeiro Pulmão-em-chip foi desenvolvido por Huh em 2010, um microdispositivo dividido longitudinalmente em 2 compartimentos por uma membrana flexível porosa de polidimetilsiloxano (PDMS). Na parte superior foram cultivadas células epiteliais em ALI, enquanto na parte vascular inferior as células endoteliais foram expostas ao fluxo laminar do meio (recriando o interface alvéolo-capilar). As duas câmaras de gás bilaterais através de vácuo cíclico permitiram estender ciclicamente a membrana, simulando os movimentos respiratórios fisiológicos, como demonstrado na Figura 7G e Figura 9.(14,39,40)

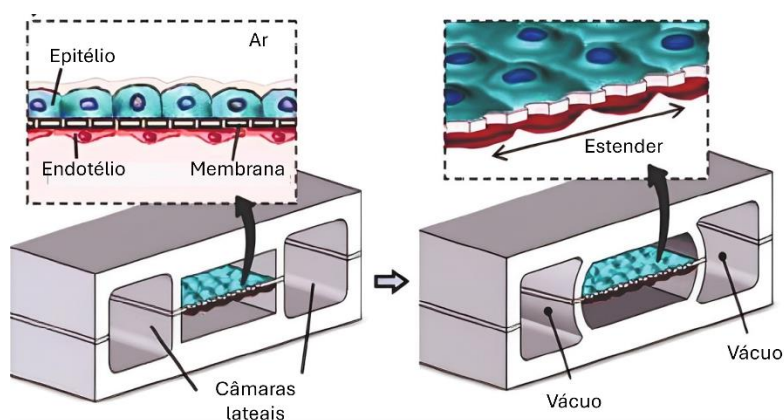


Figura 9 - Modelo Pulmão-em-chip. Retirado da referência (39).

A contração cíclica afeta a permeabilidade, atividade metabólica e a secreção de citocinas. Estes efeitos têm sido demonstrados por mecanismos fisiológicos como a diapedese de neutrófilos circulantes após estimulação do epitélio alveolar com $TNF-\alpha$

ou infecção por *E. coli*; e o aumento da permeabilidade vascular induzida por IL-2 quando o sistema está sujeito a movimentos respiratórios.(12,31)

O desenvolvimento dos pulmões-em-chip têm passado pela integração de diferentes tipos celulares pulmonares (formação de uma cultura celular mais complexa), utilização de tecnologia avançada para simular o movimento respiratório, otimização de materiais utilizados (membrana, materiais de estrutura do microchip), integração de sensores para monitorização de parâmetros fisiológicos (pH, concentração de biomarcadores, oxigenação), automação dos sistemas de sinalização e desenvolvimento de modelos com células estaminais.(5,31,41,42)

4 Conclusões e Perspetivas futuras

O principal interesse no desenvolvimento de modelos celulares *in vitro* é a substituição dos modelos animais, recriando um modelo realístico e fidedigno do sistema respiratório nativo humano.(11) A globalização e industrialização são os principais responsáveis pela crescente poluição atmosférica, com efeitos diretos e graves na saúde humana e ambiental, e que estão longe de serem minimizados. Para além da poluição do ar, recentemente, a Pandemia por COVID-19 demonstrou a vulnerabilidade e sensibilidade do sistema respiratório.(4)

Apesar da evolução destes modelos através do desenvolvimento de técnicas e tecnologias emergentes em diversas áreas científicas, não é ainda possível mimetizar exposições reais devido à complexa arquitetura espacial, biomecânica e microambiente pulmonar, heterogeneidade da composição celular, resposta imunológica e consequências sistémicas de exposição. De igual forma, a difícil estabilidade e viabilidade celular a longo prazo, associada à falta de padronização e difícil reprodutibilidade não permitem analisar a exposição prolongada a fármacos ou contaminantes.(12)

Os modelos de co-cultura atualmente disponíveis são ainda insuficientes. Embora desenvolvidos com diversos tipos celulares, não conseguem representar a complexidade do modelo *in vivo* que apresenta mais de 50 tipos de células. Por outro lado, embora estejam descritos diversos modelos (essencialmente do local alvéolo-capilar), seria oportuno o desenvolvimento de outros alternativos que recriassem locais como a cavidade nasal, faringe, tranqueia, pleura e gânglios linfáticos circundantes, por forma a considerar a interação e influência entre diferentes locais do trato respiratório.(43) Para tal, será fulcral a melhoria das técnicas de alta precisão de bioimpressão 3D e dos materiais usados em “scaffolds” e pulmão-em-chip. O estudo de solventes e materiais biocompatíveis, com capacidade viscoelástica, deformabilidade e plasticidade extremamente necessárias para mimetizar os ciclos respiratórios deve ser associado ao estudo de melhoria das técnicas por forma a diminuir as alterações celulares provocada pelas altas temperaturas, forças mecânicas e radiação.(32)

Apesar do potencial das células estaminais, ao poderem recriar todas as células necessárias para um modelo *in vitro* pulmonar, estas são tecnicamente desafiantes em

termos de obtenção (por protocolos de diferenciação com adição de fatores de crescimento, condições do meio e ambientes tridimensionais) e podem apresentar respostas variáveis a estímulos externos, tornando difícil a reprodução de resultados.(44)

Os pulmões-em-chip mostram-se promissores pela capacidade de simular diversas funções pulmonares com precisão, e pela possibilidade de serem interconectados com outros órgãos-em-chip, formando um humano-em-chip. Estão a ser adaptados para desenho de fármacos, assim como avaliação da sua toxicidade isolada, ou por administração concomitante de fármacos. Para além da toxicidade pulmonar, a formulação de multiórgãos-em-chip permite estudar os efeitos sistémicos provocados pela exposição.(11)

O potencial de aplicar diferentes variáveis (perfusão e fluxo de ar, condições de pressão e stress) nos microchips é vantajoso para estudo de exposição crónica a diferentes xenobióticos. (31)A utilização de modelos *in vitro* permite estudar populações especiais de maior risco e vulnerabilidade (idosos, grávidas, crianças) e avaliar a influência de fatores individuais (idade, sexo, etnia, suscetibilidade genética) na estrutura funcional dos pulmões nos mecanismos de patogénese. Nesta lógica, é possível estudar doenças como Asma, DPOC, e Bronquite em populações específicas, desenvolver fármacos e avaliar os possíveis efeitos tóxicos, sem necessidade de testagem *in vivo*.(44) A possibilidade de se utilizar células de doadores humanos representa um avanço na Terapêutica direcionada, permitindo estudar os mecanismos de patogénese intrínsecos do próprio doente e formulação de fármacos com alta especificidade.(32)

Por fim, a utilização de Inteligência Artificial poderá ser uma ferramenta importante para sistematizar, padronizar e relacionar grandes quantidades de dados de estudos *in vitro* de diferentes ensaios, podendo prever respostas celulares, determinantes para o desenvolvimento de modelos mais avançados e precisos, assim como um melhor entendimento dos mecanismos celulares subjacentes.

Referências Bibliográficas

1. Lee JYJ, Miller JA, Basu S, Kee TZV, Loo LH. Building predictive in vitro pulmonary toxicity assays using high-throughput imaging and artificial intelligence. *Arch Toxicol*. 2018 Jun 1;92(6):2055–75.
2. Castell J V., Donato MT, Gómez-Lechón MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2005 Jul 22;57(SUPPL. 1):189–204.
3. Levine S, Marciniuk D, Aglan A, Celedón JC, Fong K, Horsburgh R, et al. *The Global Impact of Respiratory Disease THIRD EDITION 2 WRITING COMMITTEE*.
4. Organization WH. *World health statistics 2024: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. World Health Organization; 2024. vi, 86 p.
5. Moreira A, Müller M, Costa PF, Kohl Y. *Advanced In Vitro Lung Models for Drug and Toxicity Screening: The Promising Role of Induced Pluripotent Stem Cells*. Vol. 6, *Advanced Biology*. John Wiley and Sons Inc; 2022.
6. Isabela C, Silva S, Müller NL. Drug-Induced Lung Diseases: Most Common Reaction Patterns and Corresponding High-Resolution CT Manifestations. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2006 Apr;27(2):111–6.
7. das Posses Bridi^{1,2} G, Kaiser Ururahy Nunes Fonseca^{3,4} E, Adib Kairalla^{1,5} R, Franco Amaral^{1,5} A, Guedes Baldi^{1,6} B. Drug-induced lung disease: a narrative review. *Jornal Brasileiro de Pneumologia [Internet]*. 2024 Sep 18;e20240110. Available from: <https://www.jornaldepneumologia.com.br/details/3995/en-US>
8. Distefano G, Fanzone L, Palermo M, Tiralongo F, Cosentino S, Inì C, et al. HRCT patterns of drug-induced interstitial lung diseases: A review. Vol. 10, *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020.

9. Zavala J, Freedman AN, Szilagyi JT, Jaspers I, Wambaugh JF, Higuchi M, et al. New approach methods to evaluate health risks of air pollutants: Critical design considerations for in vitro exposure testing. Vol. 17, International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI AG; 2020.
10. Conway RF, Frum T, Conchola AS, Spence JR. Understanding Human Lung Development through In Vitro Model Systems. BioEssays. 2020 Jun 1;42(6).
11. Hiemstra PS, Grootaers G, van der Does AM, Krul CAM, Kooter IM. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. Vol. 47, Toxicology in Vitro. Elsevier Ltd; 2018. p. 137–46.
12. Petpiroon N, Netkueakul W, Sukrak K, Wang C, Liang Y, Wang M, et al. Development of lung tissue models and their applications. Vol. 334, Life Sciences. Elsevier Inc.; 2023.
13. Eur. Advanced Non-animal Models in Biomedical Research Respiratory Tract Diseases. Available from: <https://ec.europa.eu/jrc>
14. Moura JA, Meldrum K, Doak SH, Clift MJD. Alternative lung cell model systems for toxicology testing strategies: Current knowledge and future outlook. Vol. 147, Seminars in Cell and Developmental Biology. Elsevier Ltd; 2023. p. 70–82.
15. Bennet TJ, Randhawa A, Hua J, Cheung KC. Airway-on-a-chip: Designs and applications for lung repair and disease. Vol. 10, Cells. MDPI; 2021.
16. editor CDK. Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons [Internet]. 8th ed. New York : McGraw-Hill Education, [2013] ©2013; Available from: <https://search.library.wisc.edu/catalog/9910153943002121>
17. BéruBé K, Prytherch Z, Job C, Hughes T. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. Vol. 278, Toxicology. 2010. p. 311–8.

18. Miller AJ, Spence JR. In vitro models to study human lung development, disease and homeostasis. Vol. 32, *Physiology*. American Physiological Society; 2017. p. 246–60.
19. Štefanac T, Grgas D, Dragičević TL. Xenobiotics—division and methods of detection: A review. Vol. 11, *Journal of Xenobiotics*. MDPI; 2021. p. 130–41.
20. Schwaiblmair M, Behr W, Haeckel T, Märkl B, Foerg W, Berghaus T. Drug Induced Interstitial Lung Disease. Vol. 6, *The Open Respiratory Medicine Journal*. 2012.
21. Spagnolo P, Bonniaud P, Rossi G, Sverzellati N, Cottin V. Drug-induced interstitial lung disease. Vol. 60, *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2022.
22. Haschek WM, Witschi HR, Nikula KJ. 28 - Respiratory System. In: HASCHEK WM, ROUSSEAU CG, WALLIG MA, editors. *Handbook of Toxicologic Pathology (Second Edition)* [Internet]. Second Edition. San Diego: Academic Press; 2002. p. 3–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123302151500296>
23. Skeoch S, Weatherley N, Swift AJ, Oldroyd A, Johns C, Hayton C, et al. Drug-induced interstitial lung disease: A systematic review. Vol. 7, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2018.
24. Matsuno O. Drug-induced interstitial lung disease: Mechanisms and best diagnostic approaches. Vol. 13, *Respiratory Research*. 2012.
25. Papiris SA, Triantafyllidou C, Kolilekas L, Markoulaki D, Manali ED. Amiodarone Review of Pulmonary Effects and Toxicity.
26. Ryrfeldt K. Drug-induced inflammatory responses to the lung [Internet]. *Toxicology Letters*. 2000. Available from: www.elsevier.com/locate/toxlet
27. Enlo-Scott Z, Bäckström E, Mudway I, Forbes B. Drug metabolism in the lungs: opportunities for optimising inhaled medicines. Vol. 17, *Expert*

Opinion on Drug Metabolism and Toxicology. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 611–25.

28. Prasad R, Gupta P, Singh A, Goel N. Drug induced pulmonary parenchymal disease. Vol. 8, Drug discoveries & therapeutics. 2014. p. 232–7.
29. Masui A, Hirai T, Gotoh S. Perspectives of future lung toxicology studies using human pluripotent stem cells. Vol. 96, Archives of Toxicology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 389–402.
30. Jaber N, Billet S. How to use an in vitro approach to characterize the toxicity of airborne compounds. Vol. 94, Toxicology in Vitro. Elsevier Ltd; 2024.
31. Nawroth JC, Barrile R, Conegliano D, van Riet S, Hiemstra PS, Villenave R. Stem cell-based Lung-on-Chips: The best of both worlds? Vol. 140, Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier B.V.; 2019. p. 12–32.
32. Dabaghi M, Carpio MB, Saraei N, Moran-Mirabal JM, Kolb MR, Hirota JA. A roadmap for developing and engineering in vitro pulmonary fibrosis models. Vol. 4, Biophysics Reviews. American Institute of Physics; 2023.
33. Gardner DE. Toxicology of the Lung, Fourth Edition. 2006.
34. Lujan H, Criscitiello MF, Hering AS, Sayes CM. Refining in Vitro Toxicity Models: Comparing Baseline Characteristics of Lung Cell Types. Toxicological Sciences. 2019 Apr 1;168(2):302–14.
35. Tavares-Negrete JA, Das P, Najafikhoshnoo S, Zanganeh S, Esfandyarpour R. Recent advances in lung-on-a-chip technology for modeling respiratory disease. Vol. 6, Bio-Design and Manufacturing. Zhejiang University; 2023. p. 563–85.
36. Bartolo P, Malshe A, Ferraris E, Koc B. 3D bioprinting: Materials, processes, and applications. CIRP Annals. 2022 Jan 1;71(2):577–97.
37. Mittal R, Woo FW, Castro CS, Cohen MA, Karanxha J, Mittal J, et al. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical

- applications. Vol. 234, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 8352–80.
38. Aazmi A, Zhou H, Li Y, Yu M, Xu X, Wu Y, et al. Engineered Vasculature for Organ-on-a-Chip Systems. Vol. 9, *Engineering*. Elsevier Ltd; 2022. p. 131–47.
 39. Francis I, Shrestha J, Paudel KR, Hansbro PM, Warkiani ME, Saha SC. Recent advances in lung-on-a-chip models. Vol. 27, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2022. p. 2593–602.
 40. Wang H, Yin F, Li Z, Su W, Li D. Advances of microfluidic lung chips for assessing atmospheric pollutants exposure. Vol. 172, *Environment International*. Elsevier Ltd; 2023.
 41. Zamprogno P, Wüthrich S, Achenbach S, Thoma G, Stucki JD, Hobi N, et al. Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Commun Biol*. 2021 Dec 1;4(1).
 42. Huh D, Torisawa YS, Hamilton GA, Kim HJ, Ingber DE. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips. Vol. 12, *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry; 2012. p. 2156–64.
 43. Shrestha J, Razavi Bazaz S, Aboulkheyr Es H, Yaghobian Azari D, Thierry B, Ebrahimi Warkiani M, et al. Lung-on-a-chip: the future of respiratory disease models and pharmacological studies. Vol. 40, *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 213–30.
 44. Goldsteen PA, Yoseif C, Dolga AM, Gosens R. Human pluripotent stem cells for the modelling and treatment of respiratory diseases. *European Respiratory Review*. 2021;30(161).

Anexos

A1. Biomarcadores e ensaios *in vitro* para avaliação da toxicidade pulmonar

Biomarcadores	Princípio do ensaio
Lactato desidrogenase extracelular (LDH)	Teste colorimétrico de citotoxicidade – avaliar integridade das membranas; LDH está presente no citosol das células e é libertada para o meio de cultura quando a membrana plasmática é interrompida; Aumento do corante produzido no sobrenadante está diretamente relacionado com o aumento do número de células lisadas.
Ensaio WST-1, MTT, XTT AlamarBlue	Teste colorimétrico para determinar a viabilidade e proliferação celular; Quantificação da atividade da succinato desidrogenase mitocondrial; Apenas as células vivas podem catalisar este processo; Absorvância medida é proporcional ao número de células vivas (metabolicamente ativas) presentes.
Ensaio de fosfatase alcalina	Teste enzimático para contagem de células - medir a proliferação celular; A fluorescência fornece uma medida da atividade enzimática total que é proporcional ao número de células; A atividade enzimática aumenta proporcionalmente com o número de células em cultura, independentemente do momento da cultura.
Resistência Elétrica Transepitelial	Medição da resistência elétrica através de uma monocamada celular; Monitoriza a integridade epitelial e das junções oclusivas, as variações de permeabilidade devido a danos/rutura da barreira celular epitelial; Apenas possível em células cultivadas em ALI.
Inflamação	Citocinas, IL, fatores de crescimento e interferão são proteínas que regulam a resposta imunitária após exposição a um xenobiótico; Citocinas promovem inflamação (citocinas pró-inflamatórias), enquanto outras diminuem (citocinas anti-inflamatórias); As citocinas têm uma variedade de impactos na proliferação e diferenciação celular; ELISA - ligação de citocina a anticorpo primário específico. O complexo resultante é identificado por um anticorpo secundário que é revelado por uma peroxidase de ligação. A intensidade da coloração determina a quantidade de citocina presente.
Teste do micronúcleo (MN)	Ensaio de genotoxicidade: durante a transição metafase/anafase os MNs são produzidos em células em divisão; Corpo extranuclear do cromossoma danificado pela perda de material genético durante a divisão celular é incluído numa ou mais células filhas durante a telófase; Mede a indução de anomalias cromossômicas.
Eletroforese em gel de célula única	Ensaio de genotoxicidade: detecção de fragmentos do DNA causada por um composto genotóxico; As células são lisadas e os núcleos são libertados por ação de agente alcalino (pH 10). Para promover a desnaturação, são então tratados com tampão básico de eletroforese (pH 13). O DNA libertado é separado eletroforeticamente e exposto a um intercalante fluorescente (brometo de etídio); DNA intacto (ainda está superenrolado) - apresenta esfera compacta; DNA danificado - fragmentos de fita simples e dupla (mais leves) que migraram para além do DNA não danificado.

Ensaio de troca de cromátídeos irmãos	Ensaio de genotoxicidade: deteta trocas recíprocas de cromátídeos irmãos idênticos; Indica precocemente a instabilidade cromossômica; Análise por coloração com 5-bromodeoxiuridina que se insere na cromatina.
Ensaio de alterações cromossômicas	Ensaio de genotoxicidade: alteração do número, forma ou estrutura interna do cromossoma (global ou parcial); Segmentos do cromossoma podem ser duplicados, separados ou transferidos para outros segmentos (translocação, inversão) devido a interrupção na divisão celular; Microscopia, cariotipagem e hibridização <i>in situ</i> por fluorescência.

Adaptado de (30)

A2. Resumo das vantagens e desvantagens de diferentes tipos de células

Modelos	Vantagens	Desvantagens
Células humanas de linhas imortalizadas	Baixo custo; Divisão ilimitada; Reprodutibilidade de ensaios; Fácil de cultivar e manter; Alta viabilidade em comparação com outros modelos; Disponível comercialmente; Padronização de resultados; Redução da variação genética em comparação com modelos primários; Potencial para incluir co-culturas; Não é necessário a adição de cofatores.	Não representa condições <i>in vivo</i> ; Perfis genéticos e epigenéticos diferem entre células cancerígenas e não cancerígenas; Ausência de características morfológicas ou funcionais importantes; Fisiologia celular alterada; Dador único, não tem em conta a variabilidade da população; Dependendo da linha celular, representação limitada de uma barreira epitelial <i>in vivo</i> ; Nem todas as células podem ser representadas por este tipo celular.
Células primárias	Melhor representação <i>in vivo</i> ; Células maduras; Especificidade genética do dador; Mantém epigeneticidade e características adquiridas; Permite avaliação de subpopulação específica de interesse (idade, doença, sexo, suscetibilidade, etc.) Maior relevância fisiológica; Pode incluir diferentes tipos de células ou monocultura; Pode simular condições crônicas.	Fonte e divisão limitada; Manutenção complexa; Sistemas difíceis de padronizar; Divisões sucessivas causam alterações genotípicas e fenotípicas; Tempo limitado para manter expressão enzimática ao longo do tempo; Difuso para determinar qual o tipo de célula que impulsiona a toxicidade observada; Custo elevado; Variação genética entre dadores.
Célula estaminais	Facilidade de obtenção; Cultivo em larga escala, mantendo um estado indiferenciado; Minimização da diferença entre lotes; Resposta fisiológica relevante.	Manutenção dispendiosa; Diferenciação nos tipos de células de interesse depende de muitas etapas; Células imaturas, não amadurecem para o estado adulto <i>in vivo</i> .

Adaptado de(5,9,11,29,31,32)

A3. Resumo das vantagens e desvantagens dos métodos *in vitro*

Modelos	Vantagens	Desvantagens	
2D	Placas de cultura de tecidos submersos	Manuseamento mais simples e fácil; Baixo custo; Permite “high throughput screening”; Versátil para representar perfis de expressão génica; Rapidez; Reprodutibilidade; Eficaz para compostos solúveis e partículas.	Não representa condições <i>in vivo</i> ; Não há contacto célula-ar; Incapacidade de gerar células ciliadas diferenciadas; Secreção de surfactante, e expressão de proteínas afetadas; Rigidez não fisiológica, estática; Co-cultura difícil; Interação célula-ME desadequada;
	Cultura ALI	Manuseamento simples e fácil; Mimetismo do interface ALI fisiológico (morfologia apical-basal, polar, produção de muco); Custo relativamente baixo; Produção ilimitada de células; Potencial diferenciação das células; Semelhança das condições <i>in vivo</i> ; Trocas gasosas ar/células; Plataformas comercializadas.	Incapacidade de mimetizar o microambiente pulmonar 3D; Estática; Sem modelagem de respostas como um órgão; Custo elevado; Difícil atmosfera de exposição estável; Necessidade de dispositivos de exposição específicos.
3D	Esferoide/ organoide	Representa vários tipos de células; Comunicação célula-célula e célula-ME; Mimetismo fisiologia nativa em organoides pulmonares (secreção de surfactante, depuração de partículas); Adequado para biobancos.	Custo elevado; Protocolos complexos para desenvolvimento e manutenção; Falta de vascularização; Dificuldade em atingir fenótipos totalmente diferenciados; Falta de estimulação mecânica; Falta de uniformidade de tamanho.
	“Scaffold”	Matriz 3D - composição química e geometria variáveis/ajustáveis; Materiais naturais e sintéticos para a sua construção.	Dificuldades em replicar de forma artificial a arquitetura pulmonar 3D; Utilização de solventes que não são biocompatíveis; Tecnologias de fabrico complexas e dispendiosas.
	ME descelularizada	Arquitetura pulmonar 3D com rede vascular preservada; Apresenta orientação próximo-distal das células.	Escassez de tecido pulmonar; Protocolos complexos para a sua obtenção; Perda de componentes da ME; Alteração das propriedades mecânicas do tecido.
	Pulmão-em-chip	Representação de diferentes compartimentos do tecido pulmonar (epitélio, tecido mesenquimal, rede vascular); Emulação eficiente do microambiente pulmonar (ALI, gradientes bioquímicos, propriedades físicas e biomecânicas);	Encontra-se em fase inicial de desenvolvimento; Desafios na co-cultura de vários tipos de células (particularmente de diferentes compartimentos de tecidos ou órgãos); Rendimento relativamente baixo; Alta complexidade; Custo elevado; Acesso limitado a células primárias específicas do doente;

	Possibilidade comunicação entre órgãos; Possibilidade de automação com a incorporação de sensores para monitorização de parâmetros biológicos; Perfusão vascular hemodinâmica; Células imunitárias circulantes; Reprodutibilidade do tamanho e forma do tecido; Amostragem repetida.	Equipamentos e protocolos laboratoriais não padronizados.
--	---	---

Adaptado de (5,9,12,31,32,43)