

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 10/12/2026.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Natália Akemi Kohori

**Comparação dos Cultivos de Células HepG2 em
Monocamada (2D) e Tridimensional (3D) na Avaliação da
Hepatotoxicidade Induzida pelos Contaminantes
Decametilciclopentasiloxane (D5) e Triclopir**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Cristina Pereira
Coorientadora: Profa. Dra. Carla dos Santos Riccardi

Natália Akemi Kohori

**Comparação dos Cultivos de Células HepG2 em
Monocamada (2D) e Tridimensional (3D) na Avaliação da
Hepatotoxicidade Induzida pelos Contaminantes
Decametilciclopentasiloxane (D5) e Triclopir**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Cristina Pereira
Coorientadora: Profa. Dra. Carla dos Santos Riccardi

Botucatu
2026

K79c

Kohori, Natália Akemi

Comparação dos cultivos de células hepg2 em monocamada (2D) e tridimensional (3D) na avaliação da hepatotoxicidade induzida pelos contaminantes decametilciclopentasiloxane (D5) e triclopir / Natália Akemi Kohori. -- , 2026

155 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu,

Orientadora: Lilian Cristina Pereira

Coorientadora: Carla dos Santos Riccardi

1. Toxicologia. 2. Citotoxicidade. 3. Cultura de células. 4. Herbicidas. 5. Células hepáticas. I. Título.

Impacto científico e social

Esta pesquisa contribui para ampliar o conhecimento sobre os efeitos de contaminantes que podem prejudicar a saúde, especialmente o fígado. Ainda há informações que precisamos saber sobre o herbicida triclopir e sobre o composto D5, encontrado em produtos de cuidado pessoal. Por isso, gerar novos dados é importante para a prevenção, diagnóstico e tratamento de intoxicações.

Assim, o impacto científico deste estudo está em entender melhor o que acontece dentro das células, como alterações na mitocôndria, morte celular e redução do crescimento. Além de comparar como diferentes tipos de modelos de laboratório utilizando a cultura de células (2D, 3D e bioimpressão 3D) respondem a esses contaminantes.

No âmbito social, este trabalho ajuda a entender melhor os riscos envolvidos à exposição humana e ambiental por produtos muito utilizados e ainda pouco regulados. Ao demonstrar potenciais danos celulares e indicar limites de segurança, a pesquisa pode apoiar a formulação de normas e políticas públicas para proteger a população. A investigação também destaca a importância de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa toxicológica, contribuindo para práticas científicas mais éticas.

Quanto ao impacto econômico, os resultados podem ajudar na avaliação da segurança de produtos e matérias-primas, favorecendo a inovação responsável. De forma complementar, a criação de modelos 3D e bioimpressos pode contribuir para o desenvolvimento de testes toxicológicos mais eficientes e econômicos, reduzindo custos e acelerando a pesquisa nos setores químico, cosmético e farmacêutico.

Esta pesquisa se alinha a diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da ONU:

- ODS 3 (Saúde e Bem-Estar) por auxiliar na prevenção de danos à saúde;
- ODS 6 (Água Potável e Saneamento) e ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) ao abordar contaminantes ambientais emergentes;
- ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) no desenvolvimento e avaliação de modelos 3D e bioimpressão;
- ODS 14 e 15 (Vida na Água e Vida Terrestre) ao fornecer conhecimento relevante para reduzir a liberação de substâncias tóxicas em ecossistemas.

Espera-se que os resultados desta dissertação possam ser utilizados como base para futuras pesquisas, desenvolvimento de regulamentações e métodos alternativos voltadas à proteção da saúde e do meio ambiente.

This research contributes to expanding knowledge about the effects of contaminants that can harm health, especially the liver. There is still information we need to know about the herbicide triclopyr and the compound D5, found in personal care products. Therefore, generating new data is important for the prevention, diagnosis, and treatment of poisoning.

Thus, the scientific impact of this study lies in better understanding what happens inside cells, such as mitochondria alterations, cell death, and reduced growth. In addition to comparing how different types of laboratory models using cell culture (2D, 3D, and 3D bioprinting) respond to these contaminants.

In the social context, this work helps to better understand the risks involved in human and environmental exposure to widely used and still poorly regulated products. By demonstrating potential cellular damage and indicating safety limits, the research can support the formulation of standards and public policies to protect the population. The investigation also highlights the importance of alternative methods to the use of animals in toxicological research, contributing to more ethical scientific practices.

Regarding the economic impact, the results can help in assessing the safety of products and raw materials, promoting responsible innovation. In addition, the creation of 3D and bioprinted models can contribute to the development of more efficient and economical toxicological tests, reducing costs and accelerating research in the chemical, cosmetic, and pharmaceutical sectors.

This research aligns with several UN 2030 Agenda for Sustainable Development - Sustainable Development Goals (SDGs):

- SDG 3 (Good Health and Well-being) by helping to prevent damage to health;
- SDG 6 (Clean Water and Sanitation) and SDG 12 (Responsible Consumption and Production) by addressing emerging environmental contaminants;
- SDG 9 (Industry, Innovation, and Infrastructure) in the development and evaluation of 3D models and bioprinting;
- SDGs 14 and 15 (Life Below Water and Life on Land) by providing relevant knowledge to reduce the release of toxic substances into ecosystems.

It is expected that the results of this dissertation can be used as a basis for future research, development of regulations, and alternative methods aimed at protecting health and the environment.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE NATÁLIA AKEMI KOHORI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 10 de dezembro de 2025, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de NATÁLIA AKEMI KOHORI, intitulada **Comparação dos Cultivos de Células HepG2 em Monocamada (2D) e Tridimensional (3D) na Avaliação da Hepatotoxicidade Induzida pelos Contaminantes Decametilciclopentasiloxane (D5) e Triclopir**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. LÍLIAN CRISTINA PEREIRA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA, Profa. Dra. LUCINÉIA DOS SANTOS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biotecnologia / UNESP / Câmpus de Assis - FCLAs, Profa. Dra. DANIELA MORAIS LEME (Participação Virtual) do(a) Departamento de Genética / Universidade Federal do Paraná, Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Documento assinado digitalmente
LILIAN CRISTINA PEREIRA
Data: 11/12/2025 08:39:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. LÍLIAN CRISTINA PEREIRA

Dedicatória

À família

Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais, Márcia e Mário, com imensa gratidão. Vocês são os maiores incentivadores da realização dos meus sonhos. Amo vocês mais do que tudo!

Ao noivo

Dedico este trabalho ao meu noivo, Lucas, meu companheiro de vida e de sonhos. Obrigada por todo amor, paciência e apoio incondicional, por me dar força nos momentos mais difíceis e por acreditar em mim mesmo quando eu duvidava.

Agradecimentos

Aos meus pais, Márcia e Mário, por todo carinho, afeto, dedicação e cuidado que me acompanharam ao longo de toda a minha vida. Agradeço profundamente o apoio incondicional em cada momento difícil da minha trajetória acadêmica.

Ao amor da minha vida, Lucas, que esteve ao meu lado nos momentos de estresse e nunca deixou de me apoiar. Agradeço de coração por compartilhar a vida comigo e tornar cada conquista ainda mais especial.

Aos meus familiares, que me apoiaram em meus estudos mesmo nos momentos de férias e nas festas em família. Sou grata por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração, risadas e desabafos. Obrigada por estarem ao meu lado e tornarem esta etapa feliz.

Aos queridos amigos do laboratório, pela ajuda, companhia e por tornarem o dia a dia de trabalho mais leve e descontraído.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo nº 2020/11128-1) e pelo fomento ao laboratório (Processo nº 2022/03045-4); e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante parte do meu doutoramento (Processo nº 88887.600147/2021-00), cujo apoio tornou possível a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche (CAPES-PrInt - Processo nº 88887.696580/2022-00) e à Universidade de Minho por me receber.

Ao Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM) e à Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEX pelo apoio e suporte na realização deste trabalho.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero e profundo agradecimento!

*Agradecimentos
especiais*

À minha orientadora, Dra. Lilian Cristina Pereira, meu mais profundo agradecimento por compartilhar seu tempo, conhecimento e experiência na realização deste trabalho. Sua orientação e dedicação foram fundamentais em todos os momentos do projeto, e sua confiança em meu potencial me motivou a superar desafios e a crescer como pesquisadora. Sou imensamente grata por todo apoio, incentivo e inspiração ao longo desta jornada.

À minha coorientadora, Dra. Carla dos Santos Riccardi, meu profundo agradecimento por me introduzir à área de bioimpressão, por compartilhar seu conhecimento e experiência. Sua orientação foi essencial para meu aprendizado e desenvolvimento nesta pesquisa.

Ao Dr. Miguel Oliveira, pelo aprendizado na área de bioimpressão e por me receber no 3B's Research Group (Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics). Agradeço a orientação e oportunidades de crescimento científico ao longo do projeto.

A todos os professores, pelos valiosos conselhos e pela ajuda que orientaram meu aprendizado. Obrigada por acreditarem em meu potencial e me inspirarem a crescer!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Os avanços tecnológicos vêm continuamente melhorando a qualidade de vida, mas também têm contribuído para a liberação de produtos químicos capazes de representar riscos à saúde humana e animal, além de causar impactos ambientais. Tais compostos podem ser classificados como contaminantes de preocupação emergente (CPEs), pois exigem esforços na pesquisa para compreender e mitigar seus impactos, como é o caso do herbicida triclopir e o decametildiclopentasiloxano (D5), presente em produtos de cuidado pessoal. Ensaios com culturas celulares são essenciais para estudar mecanismos de toxicidade, e modelos 3D, incluindo a bioimpressão, proporcionam interações célula-célula e célula-matriz de forma mais realista, aumentando a representatividade fisiológica do tecido e a predição dos ensaios toxicológicos. Assim, este estudo buscou elucidar os principais eventos envolvidos na toxicidade de dois contaminantes ambientais específicos, o triclopir e o D5, utilizando culturas de células hepáticas (HepG2) em modelos 2D, 3D e de bioimpressão, nos quais o triclopir foi avaliado em todos os sistemas, enquanto o D5 foi investigado nos modelos 2D e bioimpresso. Ademais, foi explorada a concepção de uma biotinta para o modelo de bioimpressão 3D, a fim de comparar os resultados de toxicidade. Após a exposição aos produtos químicos, as células apresentaram alterações relacionadas à morte celular, apoptose e dano mitocondrial na maior concentração do triclopir estudada, 500 $\mu\text{mol/L}$, indicando ação nociva do herbicida sobre a função mitocondrial e possível iniciadora de um processo sequencial que desencadeia a citotoxicidade. O D5 não induziu efeitos citotóxicos detectáveis nos modelos avaliados, indicando um perfil de baixa citotoxicidade nas condições experimentais testadas e reforçando a necessidade de investigações adicionais em sistemas mais complexos. Na comparação entre os modelos 2D e 3D, a matriz 3D CellFate® mostrou maior sensibilidade ao triclopir, com alterações mitocondriais e nucleares já a partir de 5 $\mu\text{mol/L}$, enquanto o hidrogel 3D bioimpresso não apresentou efeitos significativos. Em adição, os dados sobre a biotinta elaborada com uma mistura de gomas gelanas forneceram informações positivas sobre seu potencial no mimetismo mecânico em um modelo de fígado *in vitro*, mas demonstraram que se trata de um ambiente inadequado para a proliferação celular com alta degradação da matriz. Sugerindo que a biotinta apresenta potencial como *scaffold*, embora ainda demande aprimoramentos em sua formulação.

Technological advances have continuously improved quality of life, however, they have also contributed to the release of chemical substances that may pose risks to human and animal health, in addition to causing environmental impacts. Such compounds can be classified as contaminants of emerging concern (CECs), because they require research efforts to understand and mitigate their impacts, as exemplified by the herbicide triclopyr and decamethylcyclopentasiloxane (D5), found in personal care products. Cell culture assays are essential for studying toxicity mechanisms, and three-dimensional (3D) models, including bioprinting, provide more realistic cell-cell and cell-matrix interactions, thereby enhancing the physiological relevance of the tissue and the predictive power of toxicological assays. Thus, this study aimed to elucidate the main events involved in the toxicity of two specific environmental contaminants, triclopyr and D5, using human liver cell cultures (HepG2) in 2D, 3D, and bioprinted models, in which triclopyr was evaluated across all systems, whereas D5 was investigated in the 2D and bioprinted models. In addition, the development of a bioink for the 3D bioprinting model was explored in order to support toxicity comparisons. Following chemical exposure, cells exhibited alterations related to cell death, apoptosis, and mitochondrial damage at the highest triclopyr concentration tested (500 μM), indicating a harmful effect of the herbicide on mitochondrial function and a possible initiation of a sequential process leading to cytotoxicity. No detectable cytotoxic effects were observed for D5 under the experimental conditions, indicating a low cytotoxic profile and reinforcing the need for further investigations in more complex systems. In the comparison between 2D and 3D models, the CellFate® 3D matrix showed greater sensitivity to triclopyr than the 2D model, with mitochondrial and nuclear alterations starting at 5 μM , whereas the bioprinted 3D hydrogel did not exhibit significant effects. Additionally, data obtained from the bioink formulated with a mixture of gellan gums provided positive evidence of its mechanical mimicry in an *in vitro* liver model but demonstrated that it represents an unsuitable environment for cell proliferation due to high matrix degradation, suggesting that the bioink has potential as a scaffold, although further improvements in its formulation are still required.

CAPÍTULO I

Figura 1. Cenário que descreve medidas para implementar o princípio 3R em projetos de pesquisa experimental.....	27
Figura 2. Cultura de células HepG2 monocamada em diferentes confluências.....	29
Figura 3. Representação das principais diferenças entre culturas de células 2D e 3D.....	31

CAPÍTULO II

MANUSCRITO I

Graphical abstract.....	60
Figure 1. MTT reduction rate (%)......	67
Figure 2. Cellular protein content (%)......	67
Figure 3. Cell cycle, % of cells in each phase.....	68
Figure 4. Percentage (%) of cells positive for Annexin V/PI.....	69
Figure 5. Percentage (%) of cells positive for nuclear condensation and fragmentation.....	70
Figure 6. Micrographs of nuclear condensation and fragmentation after 24 hours of exposure	71
Figure 7. Micrographs of nuclear condensation and fragmentation after 48 hours of exposure	72
Figure 8. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$).....	73
Figure 9. Micrographs of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) at 24h of exposure.....	74
Figure 10. Micrographs of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) at 48h of exposure.....	76
Figure 11. ATP level.....	76
Figure 12. RONS production (%)......	78

MANUSCRITO II

Graphical abstract.....	86
Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of dried CellFate® samples: (A) dense surface and (B) porous surface. (C) Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrum.....	92
Figure 2. CellFate® matrix degradation profile in PBS solution expressed in dry weight.....	92
Figure 3. CellFate® matrix cell treated viability normalized to controls.....	93
Figure 4. The morphology of HepG2 cells grown in two-dimensional (2D) culture flasks and in a three-dimensional (3D) CellFate® matrix.....	94
Figure 5. Resazurin reduction rate (%)......	95
Figure 6. Fluorescence micrographs of the Live/Dead assay.....	96
Figure 7. Percentage (%) of cells positive for nuclear condensation and fragmentation.....	97
Figure 8. Hoechst 33342 and MitoTracker Green fluorescence micrographs.....	98

MANUSCRITO III

Graphical abstract.....	107
Fig. 1 Dynamic mechanical analysis (DMA) of the gellan gum cast cylinder bioinks.....	116

Fig. 2	(A) Scheme of the systematic method for measuring the diameter of 3D printed hydrogel fibers. (B) Photograph of 3D printed hydrogel fibers. (C) Uniformity factor of the diameter of the 3D printed hydrogel fibers (D) Frequency distribution histogram of fiber diameter.....	118
Fig. 3	(A) Degradation profile of 3D printed hydrogel scaffolds. (B) Cell viability of 3D printed hydrogels with HepG2 cells.....	119
Fig. 4	Theoretical 3D printed model and photographs of 3D printed cellular hydrogel. (B) Fluorescence micrographs of a live/dead staining of HepG2 cells in the 3D bioprinted cell-laden constructs.....	121
Fig. 5	Scheme of the systematic method for the CAM assay of 3D bioprinted hydrogel scaffolds. (B) Images <i>in ovo</i> e <i>ex ovo</i> of materials implanted in the CAM. (C) <i>In ovo</i> quantification of the blood vessels converging. (D) <i>Ex ovo</i> immunohistochemical lectin staining.....	124
MANUSCRITO IV		
	Graphical abstract.....	134
Figure 1.	A) Fluorescence micrographs from the Live/Dead assay. B) Micrographs captured using an Nikon Eclipse Ti-S inverted optical microscope.....	141
Figure 2.	A) Photograph of 3D printed cellular hydrogel B) Cell viability of 3D-printed constructs with HepG2 cells. C) Formation of HepG2 cell aggregates and growth in the 3D bioprinted constructo.....	142
Figure 3.	Resazurin reduction rate (%).....	143
Figure 4.	Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$).....	143
Figure 5.	Histological analysis of three-dimensional bioprinted constructs containing cultured HepG2 cells.....	145

CAPÍTULO I

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do decametilciclopentasiloxano.....	41
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do triclopir.....	43

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CCCP	Cianeto de carbonila clorofenilhidrazona
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
CPEs	Contaminantes de preocupação emergente
D4	Octametilciclotetrasiloxano
D5	Decametilciclopentasiloxano
D6	Dodecametilciclohexa-siloxano
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFSA	European food safety authority
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
HFS	Solução hipotônica fluorescente
MEC	Matriz extracelular
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
NAMs	Novas metodologias de abordagem
ODS	Objetivos de desenvolvimento sustentável
PCPs	Produtos de cuidados pessoais
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Iodeto de propídeo
SAS	Statistical analysis software
SDGs	Sustainable development goals
SRB	Sulforodamina B
TBEE	Triclopir butoxietil
TBHP	Terc-butil hydroperóxido
TEA	Triclopir trietilamina
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
UNESCO	Organização das nações unidas para a educação, a ciência e cultura
3R's	Reduction, replacement e refinement
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

CAPÍTULO I	24
1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Relevância de métodos alternativos em toxicologia	25
1.2 Hepatotoxicidade	27
1.3 Cultivo de células	28
1.3.1 Cultivo de células 3D	30
1.3.2 Alginatos na cultura 3D de células	33
1.3.3 Bioimpressão na cultura de células	34
1.3.4 A biotinta	36
1.4 Contaminantes de preocupação emergentes	38
1.4.1 Decametilciclopentasiloxano (D5)	39
1.4.2 Triclopir	42
REFERÊNCIAS	45
2. OBJETIVOS	56
2.1 Geral	56
2.2 Específicos	56
CAPÍTULO II	57
MANUSCRITO I	58
Abstract	59
1. Introduction	61
2. Material and methods	63
2.1 HepG2 cells compounds exposure and culturing	63
2.2 MTT reduction assay	63
2.3 Sulforhodamine B assay	64
2.4 Cell cycle analysis	64
2.5 Annexin V/PI assay	64
2.6 Nuclear abnormalities	65
2.7 Mitochondrial membrane potential	65
2.8 ATP assay	66
2.9 Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) accumulation	66
2.10 Statistical analysis	66
3. Results	66
3.1 MTT reduction assay	66
3.2 Sulforhodamine B assay	67
3.3 Cell cycle analysis	67
3.4 Annexin V/PI assay	68

3.5	Nuclear abnormalities.....	69
3.6	Mitochondrial membrane potential.....	73
3.7	ATP assay.....	76
3.8	Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) accumulation.....	76
4.	Discussion.....	77
5.	Conclusion.....	79
6.	Acknowledgements.....	80
7.	Conflict of interest statement.....	80
8.	Funding.....	80
	References.....	80
	MANUSCRITO II.....	84
	Abstract.....	85
1.	Introduction.....	87
2.	Methods.....	88
2.1	CellFate® characterization.....	88
2.2	Degradation test.....	89
2.3	Cytotoxicity test of cellFate® matrix.....	89
2.4	Comparison of HepG2 cell culture models: monolayer (2D) vs. three-dimensional (3D) systems.....	89
2.5	Resazurin assay.....	90
2.6	Live/dead assay.....	90
2.7	Abnormalities and mitochondrial network assay.....	91
2.8	Statistical analysis.....	91
3.	Results.....	91
3.1	CellFate® characterization.....	91
3.2	Degradation test.....	92
3.3	CellFate® matrix cytotoxicity test.....	93
3.4	HepG2 cells culture in monolayer (2D) and three-dimensional (3D) models.....	93
3.5	Resazurin assay.....	94
3.6	Live/dead assay.....	95
3.7	Nuclear abnormalities and mitochondrial network assay.....	97
4.	Discussion.....	99
5.	Conclusion.....	101
6.	Acknowledgements.....	102
7.	Conflict of interest statement.....	102
8.	Funding.....	102

References.....	102
MANUSCRITO III.....	105
Abstract.....	106
Introduction.....	108
Experimental.....	110
Preparation of the gellan gum bioink.....	110
Mechanical characterization of the hydrogel.....	110
3D printing of gellan gum bioink.....	111
Shape fidelity.....	111
Degradation test.....	112
HepG2 cell culturing and bioprinting of 3D cell-laden constructs.....	112
Cell viability and metabolic activity analysis.....	113
<i>In ovo</i> angiogenesis study.....	113
<i>Chorioallantoic membrane (CAM) assay.....</i>	<i>113</i>
<i>Semi-quantitative blood vessel convergence analysis.....</i>	<i>114</i>
<i>Histology.....</i>	<i>114</i>
<i>Immunohistochemistry.....</i>	<i>114</i>
Statistical analysis.....	115
Results.....	115
Surface mechanical characterization and shape fidelity of the hydrogels.....	115
Degradation test.....	119
Cell viability and proliferation analysis.....	120
<i>In ovo</i> angiogenesis study.....	122
Conclusions.....	125
Author Contributions.....	126
Conflict of interest statement.....	126
Data availability.....	126
Acknowledgements.....	126
Funding.....	126
References.....	127
MANUSCRITO IV.....	132
Abstract.....	133
1. Introduction.....	135
2. Material and methods.....	136
2.1 Bioink formulation.....	136
2.2 Cellular culture.....	136

2.3	Bioprinting and compound exposure.....	137
2.4	Analysis of cell viability and metabolic activity.....	138
2.5	Resazurin assay.....	138
2.6	Mitochondrial membrane potential.....	138
2.7	Histopathological analysis.....	139
2.8	Statistical analysis.....	139
3.	Results.....	140
3.1	Analysis of cell viability and metabolic activity.....	140
3.2	Resazurin assay.....	143
3.3	Mitochondrial mmbrane potential.....	143
3.4	Histopathological analysis.....	144
4.	Discussion.....	146
5.	Conclusion.....	148
6.	Acknowledgements.....	148
7.	Conflict of interest statement.....	148
8.	Funding.....	148
	References.....	148
	Conclusão.....	152

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

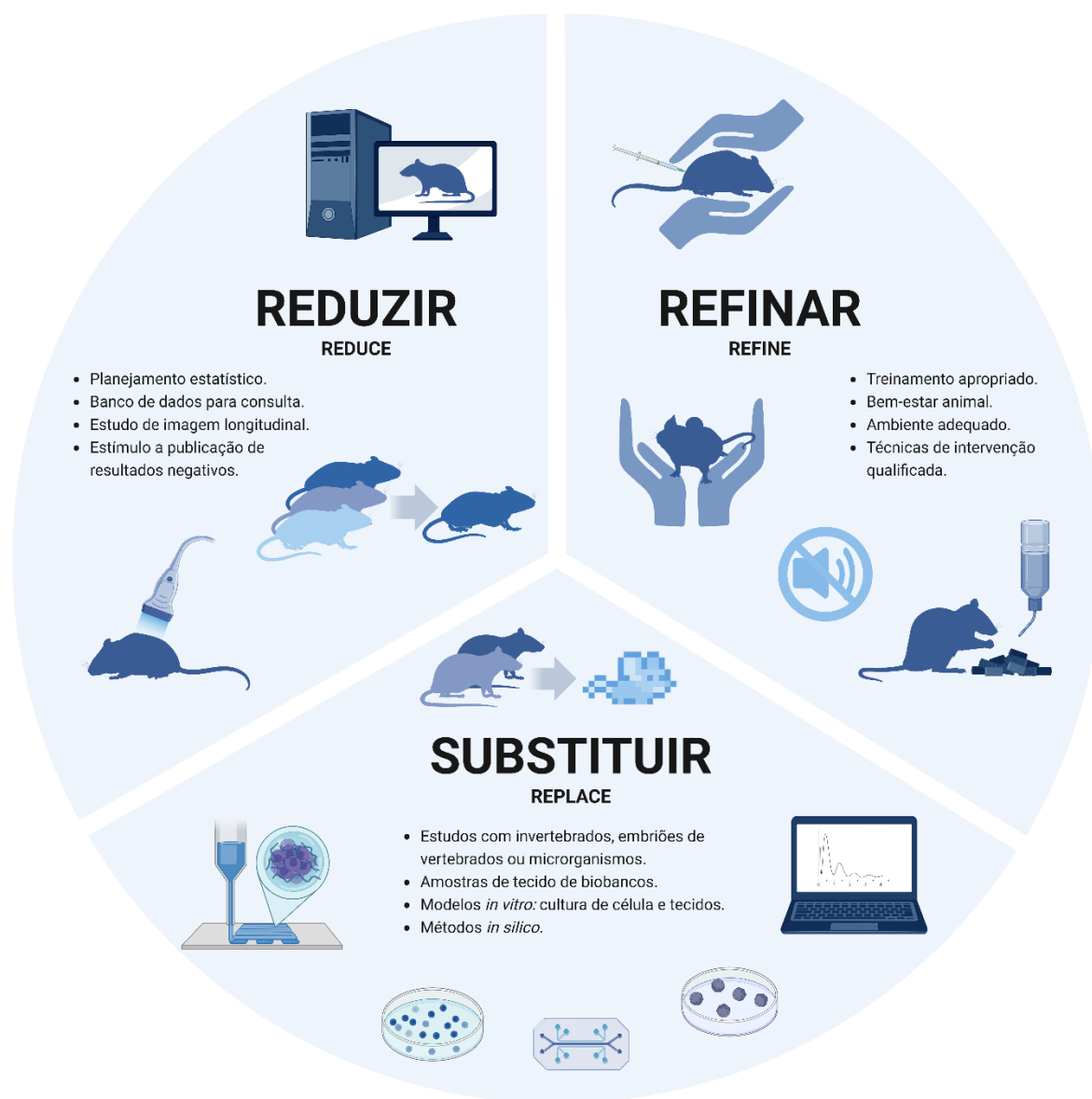
1.1 Relevância de métodos alternativos em toxicologia

Desde a antiguidade clássica, a experimentação animal foi a base do progresso científico, período no qual iniciou-se as primeiras descobertas na área do conhecimento médico (Franco, 2013). Cientistas como Hipócrates e Aristóteles realizavam dissecação e vivissecação de animais para melhor compreender o funcionamento dos órgãos e do corpo, além de compará-los aos seres humanos (Miziara *et al.*, 2012). Desde então, a evolução da ciência tem remetido ao uso de animais para fins investigativos (Doke; Dhawale, 2015). Apenas em 1641, em Massachusetts nos Estados Unidos, surgiu a primeira legislação que declarava sobre a ética e a dignidade animal. Posteriormente, diversos países adotaram atos e leis que controlam e minimizam o sofrimento animal (Hampson, 1989), culminando em 1978 na *Universal Declaration on Animal Welfare* garantido pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e Cultura (UNESCO).

Os anos seguintes foram marcados pelo desenvolvimento intenso de modelos experimentais alternativos para diversas áreas de pesquisa, em substituição ao uso de animais de laboratório (Anvisa, 2012). No Brasil, o engajamento relacionado a aceitação de métodos alternativos se consolida com a Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) reconheceu o uso no país de 17 métodos alternativos que são validados e possuem regulação internacional. Em especial o Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro* que se ampara no cultivo celular. Além disso, o CONCEA estabeleceu um prazo de cinco anos para que fosse realizada a substituição completa e obrigatória do método original pelo método alternativo, quando disponível. Com o passar do tempo, diversos ensaios foram adicionados às Resoluções Normativas. A Resolução Normativa mais recente é a CONCEA/MCTI nº 73, publicada em 10 de fevereiro de 2025 e está cada vez mais robusta. Contando com um total de 41 metodologias alternativas à experimentação animal e 14 desfechos experimentais. Atualmente, três atos normativos dispõem sobre esses métodos: Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 35 (Anvisa, 2015), Orientação Técnica nº 9 (Concea, 2016) e Resolução Normativa nº 54 (Concea, 2022). Eles oficializam os métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica já reconhecidos internacionalmente. Além de determinar que as novas metodologias devem passar pela Câmara Permanente de Métodos Alternativos, preconizando sanções para quem descumprir as normas.

Neste contexto, novas ferramentas vêm sendo desenvolvidas, validadas e aplicadas pelos toxicologistas para atestar a segurança de substâncias químicas, aplicando o conceito dos 3R's (do inglês *Reduction, Replacement e Refinement*) no uso de animais, Figura 1 (Arck, 2019; Gorzalczany; Rodriguez Basso, 2021). Desta forma, progressivamente os métodos alternativos também passaram a ser contemplados na etapa da avaliação dos efeitos toxicológicos e regulamentação de substâncias químicas (Anvisa, 2012). Consolidados já em 1959, os conceitos dos 3R's indicam a necessidade de redução do uso de animais em experimentação e, quando possível, a substituição dos ensaios *in vivo* por testes sensíveis e informativos, buscando reduzir ou eliminar o sofrimento destes animais (Eggel; Würbel, 2021). A substituição pode ser de forma “relativa”, no qual são utilizados animais, mas eles não são expostos a qualquer sofrimento, ou substituição “absoluta”, onde não há uso de animais em nenhuma fase do experimento (Louis-Maerten *et al.*, 2024). Desta forma, métodos alternativos, testes *in vitro* e novas metodologias de abordagem (NAMs) são técnicas que podem substituir ou diminuir o uso de animais na experimentação (Sewell *et al.*, 2024). Dentro desta temática, culturas de linhagens celulares humanas apresentam-se como forte tendência internacional para otimização desses métodos (Freudenrich; Shafer, 2020).

Figura 1: Cenário que descreve medidas para implementar o princípio 3R em projetos de pesquisa experimental.



Fonte: Arck, 2019 adaptado.

REFERÊNCIAS

- AHRENS, W. H.; EDWARDS, M. T.; WEED SCIENCE SOCIETY OF, A.; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA HERBICIDE HANDBOOK, C. Herbicide handbook. 7th ed ed. Champaign, Ill.: Weed Science Society of America, 1994. 0911733183; 9780911733181.
- AINSLIE, G. R.; DAVIS, M.; EWART, L.; LIEBERMAN, L. A. et al. Microphysiological lung models to evaluate the safety of new pharmaceutical modalities: a biopharmaceutical perspective. *Lab on a Chip*, 19, n. 19, p. 3152-3161, 2019. 10.1039/C9LC00492K.
- AKKINENI, A. R.; ELICI, B. S.; LODE, A.; GELINSKY, M. Addition of High Acyl Gellan Gum to Low Acyl Gellan Gum Enables the Blends 3D Bioprintable. *Gels*, 8, n. 4, Mar 23 2022.
- AL KHATEB, K.; OZHMUKHAMETOVA, E. K.; MUSSIN, M. N.; SEILKHANOV, S. K. et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 502, n. 1, p. 70-79, 2016/04/11/ 2016.
- ALAEI, M.; GOUIN, T.; WANG, D.-G. Cyclic volatile methylsiloxanes in the environment. *Chemosphere*, 93, 11/21 2012.
- ALBRECHT, F. B.; DOLDERER, V.; NELLINGER, S.; SCHMIDT, F. F. et al. Gellan Gum Is a Suitable Biomaterial for Manual and Bioprinted Setup of Long-Term Stable, Functional 3D-Adipose Tissue Models. *Gels*, 8, n. 7, Jul 5 2022.
- ALI, A. S. M.; WU, D.; BANNACH-BROWN, A.; DHAMRAIT, D. et al. 3D bioprinting of liver models: A systematic scoping review of methods, bioinks, and reporting quality. *Mater Today Bio*, 26, p. 100991, Jun 2024.
- ÁLVAREZ-FLÓREZ, J.; EGUSQUIZA, E. Analysis of damage caused by siloxanes in stationary reciprocating internal combustion engines operating with landfill gas. *Engineering Failure Analysis*, 50, p. 29-38, 2015/04/01/ 2015.
- ANVISA, A. N. d. V. S. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2 ed. Brasília, 2012.
- ANVISA, A. N. d. V. S. T28 – Triclopir. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/t/4534json-file-1/view> 2022.
- ARCK, P. C. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. *Journal of Reproductive Immunology*, 132, p. 54-59, 2019/04/01/ 2019.
- ARZUMANIAN, V. A.; KISELEVA, O. I.; POVERENNAYA, E. V. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci*, 22, n. 23, Dec 4 2021.
- ASKARI, M.; AFZALI NANIZ, M.; KOUHI, M.; SABERI, A. et al. Recent progress in extrusion 3D bioprinting of hydrogel biomaterials for tissue regeneration: A comprehensive review with focus on advanced fabrication techniques. *Biomaterials Science*, 10/10 2020.
- ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 134, n. 1, p. 82-106, 2012/04/01/ 2012.
- BADEKILA, A. K.; KINI, S.; JAISWAL, A. K. Fabrication techniques of biomimetic scaffolds in three-dimensional cell culture: A review. *J Cell Physiol*, 236, n. 2, p. 741-762, Feb 2021.
- BARLOW, S. M.; TERRY, C.; GEHEN, S.; CORVARO, M. Developmental toxicity studies on triclopyr acid, triclopyr butoxyethyl ester and triclopyr triethylamine salt in the rabbit. *Food and Chemical Toxicology*, 161, p. 112845, 2022/03/01/ 2022a.
- BARLOW, S. M.; TERRY, C.; GEHEN, S.; CORVARO, M. Reproductive and developmental evaluations of triclopyr acid, triclopyr butoxyethyl ester and triclopyr triethylamine salt in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 161, p. 112806, 2022/03/01/ 2022b.

- BARTELS, M.; BROWN, C.; CHUNG, G.; CHAN, M. et al. Review of the pharmacokinetics and metabolism of triclopyr herbicide in mammals: Impact on safety assessments. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 116, p. 104714, 2020/10/01/ 2020.
- BENSAÏD, W.; TRIFFITT, J. T.; BLANCHAT, C.; OUDINA, K. et al. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, 24, n. 14, p. 2497-2502, Jun 2003.
- BERNAUER, U.; BODIN, L.; CELLENO, L.; CHAUDHRY, Q. et al. SCCS OPINION ON decamethylcyclopentasiloxane (cyclopentasiloxane, D5) in cosmetic products. 2016.
- BERTONI, Í.; SALES, B. C. P.; VIRIATO, C.; PEIXOTO, P. V. L. et al. Embryotoxicity Induced by Triclopyr in Zebrafish (*Danio rerio*) Early Life Stage. *Toxics*, 12, n. 4, Mar 29 2024.
- BLONDET, N. M.; MESSNER, D. J.; KOWDLEY, K. V.; MURRAY, K. F. Chapter 43 - Mechanisms of Hepatocyte Detoxification. In: SAID, H. M. (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Sixth Edition): Academic Press, 2018. p. 981-1001.
- BONIFACIO, M. A.; COMETA, S.; COCHIS, A.; SCALZONE, A. et al. A bioprintable gellan gum/lignin hydrogel: a smart and sustainable route for cartilage regeneration. *Int J Biol Macromol*, 216, p. 336-346, Sep 1 2022.
- BREDENOORD, A. L.; CLEVERS, H.; KNOBLICH, J. A. Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. *Science*, 355, n. 6322, Jan 20 2017.
- BROOKE, D.; CROOKES, M.; GRAY, D.; ROBERTSON, S. Environmental Risk Assessment Report: Decamethylcyclopentasiloxane Environment Agency of England and Wales, 2009.
- CACACCIO, J.; DURRANI, F.; CHERUKU, R. R.; BORAH, B. et al. Pluronic F-127: An Efficient Delivery Vehicle for 3-(1'-hexyloxy)ethyl-3-devinylpyropheophorbide-a (HPPH or Photochlor). *Photochem Photobiol*, 96, n. 3, p. 625-635, May 2020.
- CARMICHAEL, N. G.; NOLAN, R. J.; PERKINS, J. M.; DAVIES, R. et al. Oral and dermal pharmacokinetics of triclopyr in human volunteers. *Hum Toxicol*, 8, n. 6, p. 431-437, Nov 1989.
- CERNENCU, A. I.; IONIȚĂ, M. The current state of the art in gellan-based printing inks in tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 309, p. 120676, 2023/06/01/ 2023.
- CESSNA, A. J.; GROVER, R.; WAITE, D. T. Environmental fate of triclopyr. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 174, p. 19-48, 2002.
- CHOI, J. M.; OH, S. J.; LEE, S. Y.; IM, J. H. et al. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Arch Pharm Res*, 38, n. 5, p. 691-704, 2015.
- CHORMARE, R.; KUMAR, M. A. Environmental health and risk assessment metrics with special mention to biotransfer, bioaccumulation and biomagnification of environmental pollutants. *Chemosphere*, 302, p. 134836, 2022/09/01/ 2022.
- CHUNG, T. W.; YANG, J.; AKAIKE, T.; CHO, K. Y. et al. Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, 23, n. 14, p. 2827-2834, Jul 2002.
- COSTA, J. B.; PARK, J.; JORGENSEN, A. M.; SILVA-CORREIA, J. et al. 3D Bioprinted Highly Elastic Hybrid Constructs for Advanced Fibrocartilaginous Tissue Regeneration. *Chemistry of Materials*, 32, n. 19, p. 8733-8746, 2020/10/13 2020.
- CUI, S.; FU, Q.; AN, L.; YU, T. et al. Trophic transfer of cyclic methyl siloxanes in the marine food web in the Bohai Sea, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178, p. 86-93, 2019/08/30/ 2019.
- D'ANTONINO, L.; SILVA, A.; FERREIRA, L.; CECON, P. et al. Lixiviação do picloram em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo com diferentes valores de pH. *Planta Daninha*, 27, p. 589-600, 2009.

- DEL BAKHSHAYESH, A. R.; ASADI, N.; ALIHEMMATI, A.; TAYEFI NASRABADI, H. et al. An overview of advanced biocompatible and biomimetic materials for creation of replacement structures in the musculoskeletal systems: focusing on cartilage tissue engineering. *Journal of Biological Engineering*, 13, n. 1, p. 85, 2019/11/13 2019.
- DERNOWSEK, J.; REZENDE, R.; SILVA, J. BioCAE: A New Strategy of Complex Biological Systems for Biofabrication of Tissues and Organs. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 8, p. 200, 06/17 2017.
- DI SPIRITO, N. A.; GRIZZUTI, N.; PASQUINO, R. Self-assembly of Pluronics: A critical review and relevant applications. *Physics of Fluids*, 36, n. 11, 2024.
- DING, B.-S.; NOLAN, D. J.; BUTLER, J. M.; JAMES, D. et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*, 468, n. 7321, p. 310-315, 2010.
- DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J*, 23, n. 3, p. 223-229, Jul 2015.
- DONATO, M. T.; TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol*, 1250, p. 77-93, 2015.
- DUVAL, K.; GROVER, H.; HAN, L. H.; MOU, Y. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*, 32, n. 4, p. 266-277, Jul 2017.
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance triclopyr. *EFSA Journal*, 4, n. 1, p. 56r, 2006.
- EGGEL, M.; WÜRBEL, H. Internal consistency and compatibility of the 3Rs and 3Vs principles for project evaluation of animal research. *Laboratory Animals*, 55, n. 3, p. 233-243, 2021.
- EGLIN, R. M.; RANDLE, D. H. Drug Discovery Goes Three-Dimensional: Goodbye to Flat High-Throughput Screening? *Assay Drug Dev Technol*, 13, n. 5, p. 262-265, Jun 2015.
- EHRMANN, R. L.; GEY, G. O. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst*, 16, n. 6, p. 1375-1403, Jun 1956.
- ELTOM, A.; ZHONG, G.; MUHAMMAD, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, p. 3429527, 2019/03/07 2019.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; NAÏK, A.; KALIA, Y. N. et al. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci*, 9, n. 3, p. 339-358, 2006.
- FANG, Y.; EGLIN, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov*, 22, n. 5, p. 456-472, Jun 2017.
- FARASANI, A.; DARBRE, P. D. Exposure to cyclic volatile methylsiloxanes (cVMS) causes anchorage-independent growth and reduction of BRCA1 in non-transformed human breast epithelial cells. *J Appl Toxicol*, 37, n. 4, p. 454-461, Apr 2017.
- FEKETSHANE, Z.; ALVEN, S.; ADERIBIGBE, B. A. Gellan Gum in Wound Dressing Scaffolds. *Polymers (Basel)*, 14, n. 19, Sep 30 2022.
- FLIEDNER, A.; RÜDEL, H.; DREYER, A.; PIRNTKE, U. et al. Chemicals of emerging concern in marine specimens of the German Environmental Specimen Bank. *Environmental Sciences Europe*, 32, 03/02 2020.
- FOWLER, E. B.; CUENIN, M. F.; HOKETT, S. D.; PEACOCK, M. E. et al. Evaluation of pluronic polyols as carriers for grafting materials: study in rat calvaria defects. *J Periodontol*, 73, n. 2, p. 191-197, Feb 2002.
- FRANCO, N. H. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals (Basel)*, 3, n. 1, p. 238-273, Mar 19 2013.

- FREUDENRICH, T. M.; SHAFER, T. J. Chapter 33 - Mammalian cell culture models. In: POPE, C. N. e LIU, J. (Ed.). *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology*: Academic Press, 2020. p. 463-475.
- GARCÍA-CAÑAVÉRAS, J. C.; CASTELL, J. V.; DONATO, M. T.; LAHOZ, A. A metabolomics cell-based approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. *Sci Rep*, 6, p. 27239, Jun 6 2016.
- GEBHARDT, R.; HENGSTLER, J. G.; MÜLLER, D.; GLÖCKNER, R. et al. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev*, 35, n. 2-3, p. 145-213, May-Aug 2003.
- GETSINGER, K. D.; PETTY, D. G.; MADSEN, J. D.; SKOGERBOE, J. G. et al. Aquatic dissipation of the herbicide triclopyr in Lake Minnetonka, Minnesota. *Pest Management Science*, 56, n. 5, p. 388-400, 2000.
- GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G. et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3, n. 1, p. 57-65, 2015/03/01/ 2015.
- GOBAS, F. A.; POWELL, D. E.; WOODBURN, K. B.; SPRINGER, T. et al. Bioaccumulation of decamethylpentacyclosiloxane (D5): A review. *Environ Toxicol Chem*, 34, n. 12, p. 2703-2714, Dec 2015.
- GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, n. 3, p. 267-285, 1998/05/04/ 1998.
- GONZÁLEZ-RUBIO, S.; BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; ASIMAKOPOULOS, A. G.; JASPERS, V. L. B. A review on contaminants of emerging concern in European raptors (2002–2020). *Science of The Total Environment*, 760, p. 143337, 2021/03/15/ 2021.
- GOPINATHAN, J.; NOH, I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater Res*, 22, p. 11, 2018.
- GORI, M.; GIANNITELLI, S. M.; TORRE, M.; MOZETIC, P. et al. Biofabrication of Hepatic Constructs by 3D Bioprinting of a Cell-Laden Thermogel: An Effective Tool to Assess Drug-Induced Hepatotoxic Response. *Adv Healthc Mater*, 9, n. 21, p. e2001163, Nov 2020.
- GORZALCZANY, S. B.; RODRIGUEZ BASSO, A. G. Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9, n. 5, p. e00863, Oct 2021.
- GREVE, K.; NIELSEN, E.; LADEFOGED, O. Siloxanes (D3, D4, D5, D6, HMDS): Evaluation of health hazards and proposal of a health-based quality criterion for ambient air. Division of Toxicology and Risk Assessment. National Food Institute, Technical University of Denmark. The Danish Environmental Protection Agency. 2014.
- GU, Z.; FU, J.; LIN, H.; HE, Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, n. 5, p. 529-557, 2020/09/01/ 2020.
- GUILHERME, S.; SANTOS, M. A.; GAIVÃO, I.; PACHECO, M. Genotoxicity evaluation of the herbicide Garlon® and its active ingredient (triclopyr) in fish (*Anguilla anguilla* L.) using the comet assay. *Environ Toxicol*, 30, n. 9, p. 1073-1081, Sep 2015.
- HABANJAR, O.; DIAB-ASSAF, M.; CALDEFIE-CHEZET, F.; DELORT, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*, 22, n. 22, Nov 11 2021.
- HAMPSON, J. Legislation and the Changing Consensus. In: LANGLEY, G. (Ed.). *Animal Experimentation: The Consensus Changes*. London: Macmillan Education UK, 1989. p. 219-251.
- HAQUE, T.; CHEN, H.; OUYANG, W.; MARTONI, C. et al. In vitro study of alginate–chitosan microcapsules: an alternative to liver cell transplants for the treatment of liver failure. *Biotechnology Letters*, 27, n. 5, p. 317-322, 2005/03/01 2005.
- HIEMSTRA, S.; RAMAIAHGARI, S. C.; WINK, S.; CALLEGARO, G. et al. High-throughput confocal imaging of differentiated 3D liver-like spheroid cellular stress response reporters for identification of drug-induced liver injury liability. *Arch Toxicol*, 93, n. 10, p. 2895-2911, Oct 2019.

HÖLZL, K.; LIN, S.; TYTGAT, L.; VAN VLIERBERGHE, S. et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8, n. 3, p. 032002, 2016/09/23 2016.

HONG, S.; SONG, J. M. A 3D cell printing-fabricated HepG2 liver spheroid model for high-content in situ quantification of drug-induced liver toxicity. *Biomaterials Science*, 9, n. 17, p. 5939-5950, 2021. 10.1039/D1BM00749A.

HOPE, B. K.; PILLSBURY, L.; BOLING, B. A state-wide survey in Oregon (USA) of trace metals and organic chemicals in municipal effluent. *Science of The Total Environment*, 417-418, p. 263-272, 2012/02/15/ 2012.

HORII, Y.; KANNAN, K. Survey of organosilicone compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products. *Arch Environ Contam Toxicol*, 55, n. 4, p. 701-710, Nov 2008.

HOSPODIUK, M.; DEY, M.; SOSNOSKI, D.; OZBOLAT, I. T. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv*, 35, n. 2, p. 217-239, Mar-Apr 2017.

HOWARD, P. H.; MUIR, D. C. Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce II: pharmaceuticals. *Environ Sci Technol*, 45, n. 16, p. 6938-6946, Aug 15 2011.

HULL, C. W. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. United States Patent, Appl., No. 638905, Filed, 1984.

HWANG, H. H.; YOU, S.; MA, X.; KWE, L. et al. High throughput direct 3D bioprinting in multiwell plates. *Biofabrication*, 13, n. 2, Mar 10 2021.

IBAMA, I. B. d. M. A. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Painéis de informações de agrotóxicos. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos> 2022.

IVASCU, A.; KUBBIES, M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen*, 11, n. 8, p. 922-932, Dec 2006.

JAVITT, N. B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *Faseb j*, 4, n. 2, p. 161-168, Feb 1 1990.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*, 7, p. 33, 2020.

JUDSON, R. S.; HOUCK, K. A.; KAVLOCK, R. J.; KNUDSEN, T. B. et al. In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project. *Environ Health Perspect*, 118, n. 4, p. 485-492, Apr 2010.

KALOGEROPOULOU, F.; PAPAILIOU, D.; PROTOPAPA, C.; SIAMIDI, A. et al. Design and Development of Low- and Medium-Viscosity Alginate Beads Loaded with Pluronic® F-127 Nanomicelles. *Materials*, 16, n. 13, p. 4715, 2023.

KAMALIAN, L.; CHADWICK, A. E.; BAYLISS, M.; FRENCH, N. S. et al. The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicol In Vitro*, 29, n. 4, p. 732-740, Jun 2015.

KANYUCK, K. M.; MILLS, T. B.; NORTON, I. T.; NORTON-WELCH, A. B. Swelling of high acyl gellan gum hydrogel: Characterization of network strengthening and slower release. *Carbohydrate Polymers*, 259, p. 117758, 2021/05/01/ 2021.

KAZAMA, R.; FUJITA, S.; SAKAI, S. Cell Dome as an Evaluation Platform for Organized HepG2 Cells. *Cells*, 12, n. 1, Dec 23 2022.

KELM, J. M.; TIMMINS, N. E.; BROWN, C. J.; FUSSENEGGER, M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*, 83, n. 2, p. 173-180, Jul 20 2003.

- KENT, D.; FACKLER, P.; HARTLEY, D.; HOBSON, J. Interpretation of data from nonstandard studies: The fate of octamethylcyclotetrasiloxane in a sediment/water microcosm system. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 11, n. 2, p. 145-149, 1996.
- KHALIQ, N. U.; LEE, J.; KIM, S.; SUNG, D. et al. Pluronic F-68 and F-127 Based Nanomedicines for Advancing Combination Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 15, n. 8, p. 2102, 2023.
- KHANG, G.; LEE, S. K.; KIM, H. N.; SILVA-CORREIA, J. et al. Biological evaluation of intervertebral disc cells in different formulations of gellan gum-based hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med*, 9, n. 3, p. 265-275, Mar 2015.
- KHATI, V.; RAMACHANDRAIAH, H.; PATI, F.; SVAHN, H. A. et al. 3D Bioprinting of Multi-Material Decellularized Liver Matrix Hydrogel at Physiological Temperatures. *Biosensors*, 12, n. 7, p. 521, 2022.
- KLEBE, R. J. Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *Experimental Cell Research*, 179, n. 2, p. 362-373, 1988/12/01/ 1988.
- KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402, n. 1, p. 185-202, 1998/06/18/ 1998.
- KUMARI, K.; SINGH, A.; MARATHE, D. Cyclic volatile methyl siloxanes (D4, D5, and D6) as the emerging pollutants in environment: environmental distribution, fate, and toxicological assessments. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, n. 27, p. 38681-38709, 2024/06/01 2024.
- LAN, S.-F.; SAFIEJKO-MROCZKA, B.; STARLY, B. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: A study of cell viability, morphology and drug metabolism. *Toxicology in Vitro*, 24, n. 4, p. 1314-1323, 2010/06/01/ 2010.
- LANGHANS, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*, 9, p. 6, 2018.
- LASSEN C; HANSEN CL; MIKKELSEN SH; J., M. Siloxanes-Consumption, Toxicity and Alternatives. The Danish Environmental Protection Agency. 2005.
- LECLUYSE, E. L.; WITEK, R. P.; ANDERSEN, M. E.; POWERS, M. J. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol*, 42, n. 6, p. 501-548, Jul 2012.
- LEE, J.; KIM, K.; PARK, S.-M.; KWON, J.-S. et al. Effects of Decamethylcyclopentasiloxane on Reproductive Systems in Female Rats. *Toxics*, 11, n. 4, p. 302, 2023.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 37, n. 1, p. 106-126, Jan 2012.
- LEROUX, M. A.; GUILAK, F.; SETTON, L. A. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *J Biomed Mater Res*, 47, n. 1, p. 46-53, Oct 1999.
- LI, Q.; ENGBRECHT, J. BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressor Function in Meiosis. *Front Cell Dev Biol*, 9, p. 668309, 2021.
- LI, Z.; LI, S.; YANG, J.; HA, Y. et al. 3D bioprinted gelatin/gellan gum-based scaffold with double-crosslinking network for vascularized bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 290, p. 119469, 2022/08/15/ 2022.
- LIGHT, S.; HANSON, B. Herbicide Damage Symptoms on Hemp. 2021.
- LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology, 2025.
- LOUIS-MAERTEN, E.; RODRIGUEZ PEREZ, C.; CAJIGA, R. M.; PERSSON, K. et al. Conceptual foundations for a clarified meaning of the 3Rs principles in animal experimentation. *Anim Welf*, 33, p. e37, 2024.

- LUCKERT, C.; SCHULZ, C.; LEHMANN, N.; THOMAS, M. et al. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. *Arch Toxicol*, 91, n. 1, p. 393-406, Jan 2017.
- MA, X.; LIU, J.; ZHU, W.; TANG, M. et al. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, p. 235-251, 2018/07/01/ 2018.
- MACKAY, D.; COWAN-ELLSBERRY, C. E.; POWELL, D. E.; WOODBURN, K. B. et al. Decamethylcyclopentasiloxane (D5) environmental sources, fate, transport, and routes of exposure. *Environ Toxicol Chem*, 34, n. 12, p. 2689-2702, Dec 2015.
- MAHANAYAK, B. Biotransformation reactions of xenobiotics: Mechanisms and implications for environmental and human health. 19, p. 158-164, 07/10 2024.
- MANUGUERRA, S.; CARLI, F.; SCODITTI, E.; SANTULLI, A. et al. Effects of Mixtures of Emerging Pollutants and Drugs on Modulation of Biomarkers Related to Toxicity, Oxidative Stress, and Cancer. *Metabolites*, 14, n. 10, Oct 17 2024.
- MASSA, S.; SAKR, M. A.; SEO, J.; BANDARU, P. et al. Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis. *Biomicrofluidics*, 11, n. 4, p. 044109, Jul 2017.
- MATAI, I.; KAUR, G.; SEYEDSALEHI, A.; MCCLINTON, A. et al. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, 226, p. 119536, 2020/01/01/ 2020.
- MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research? *Genes Nutr*, 4, n. 1, p. 13-22, Mar 2009.
- MCCALL, P. J.; GAVIT, P. D. Aqueous photolysis of triclopyr and its butoxyethyl ester and calculated environmental photodecomposition rates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5, n. 10, p. 879-885, 1986.
- MIZIARA, I. D.; MAGALHÃES, A. T. d. M.; SANTOS, M. d. A.; GOMES, É. F. et al. Research ethics in animal models. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 78, n. 2, p. 128-131, 2012.
- MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, K.; JAMRÓGIEWICZ, M.; SZYMKOWSKA, K.; KRENCZKOWSKA, D. Direct Human Contact with Siloxanes (Silicones) - Safety or Risk Part 1. Characteristics of Siloxanes (Silicones). *Front Pharmacol*, 7, p. 132, 2016.
- MONTAGNER, C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova*, 40, 07/11 2017.
- MORIN-CRINI, N.; LICHTFOUSE, E.; LIU, G.; BALARAM, V. et al. Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20, n. 4, p. 2311-2338, 2022/08/01 2022.
- MOXON, S. R.; SMITH, A. M. Controlling the rheology of gellan gum hydrogels in cell culture conditions. *Int J Biol Macromol*, 84, p. 79-86, Mar 2016.
- MUELLER, D.; KOETEMANN, A.; NOOR, F. Organotypic Cultures of Hepg2 Cells for In Vitro Toxicity Studies. *Journal Bioengineering and biomedical science*, doi:10.4172/2155-9538.S2-002, 12/01 2011.
- MÜLLER, M.; BECHER, J.; SCHNABELRAUCH, M.; ZENOBI-WONG, M. Printing thermoresponsive reverse molds for the creation of patterned two-component hydrogels for 3D cell culture. *J Vis Exp*, n. 77, p. e50632, Jul 10 2013.
- MÜLLER, M.; BECHER, J.; SCHNABELRAUCH, M.; ZENOBI-WONG, M. Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. *Biofabrication*, 7, n. 3, p. 035006, Aug 11 2015.
- MURUA, A.; PORTERO, A.; ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R. M. et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J Control Release*, 132, n. 2, p. 76-83, Dec 8 2008.

- NEWTON, M.; ROBERTS, F.; ALLEN, A.; KELPSAS, B. et al. Deposition and dissipation of three herbicides in foliage, litter, and soil of brushfields of southwest Oregon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, n. 2, p. 574-583, 1990/02/01 1990.
- NGUYEN, T. V.; KUMAR, A.; TRANG, P. N. The use of fish cell lines as in-vitro ecotoxicological tools: A cellular solution to aquaculture sustainability. *Aquaculture*, p. 741302, 2024/06/28/ 2024.
- OGAWA, M.; KITAMOTO, J.; TAKEDA, T.; HORI, M. et al. Decamethylcyclopentasiloxane affects estradiol production in female rats but not H295R cells. *J Appl Toxicol*, 43, n. 12, p. 1883-1898, Dec 2023.
- PALMEIRA, C. M. M.; OLIVEIRA, D. P. d.; DORTA, D. J. *Toxicity Assessment Methods and Protocols*. Humana New York, NY, 2021. XII, 266 p. (Methods in Molecular Biology. 978-1-0716-1091-6 Published: 09 January 2021.
- PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, n. 10, p. 839-845, Oct 2007.
- PAMPALONI, F.; STELZER, E. Three-dimensional cell cultures in toxicology. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 26, p. 117-138, 2010.
- PARKINSON, A.; OGILVIE, B. W.; BUCKLEY, D. B.; KAZMI, F. et al. *Biotransformation of xenobiotics. Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*, p. 193-430, 2019.
- PASSANITI, A.; KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: history/background, uses, and future applications. *J Cell Commun Signal*, 16, n. 4, p. 621-626, Dec 2022.
- PENG, W.; DATTA, P.; AYAN, B.; OZBOLAT, V. et al. 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomaterialia*, 57, p. 26-46, 2017/07/15/ 2017.
- PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, A. O.; FRANCO BERNARDES, M. F.; PAZIN, M. et al. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22, n. 18, p. 13800-13823, Sep 2015.
- PÉREZ-LUCAS, G.; VELA, N.; ABELLÁN, M.; FENOLL, J. et al. Use of Index-Based Screening Models to Evaluate the Leaching of Triclopyr and Fluroxypyr Through a Loam Soil Amended with Vermicompost. *Bull Environ Contam Toxicol*, 104, n. 4, p. 497-502, Apr 2020.
- PERSAUD, A.; MAUS, A.; STRAIT, L.; ZHU, D. 3D Bioprinting with Live Cells. *Engineered Regeneration*, 3, n. 3, p. 292-309, 2022/09/01/ 2022.
- PETROVIC, M.; BARCELO, D. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Emerging Environmental Contaminants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385, p. 422-424, 07/01 2006.
- POYNTON, H.; ROBINSON, W. Contaminants of Emerging Concern, With an Emphasis on Nanomaterials and Pharmaceuticals. In, 2018. p. 291-315.
- PRATA, J. C.; DA COSTA, J. P.; LOPES, I.; ANDRADY, A. L. et al. A One Health perspective of the impacts of microplastics on animal, human and environmental health. *Science of The Total Environment*, 777, p. 146094, 2021/07/10/ 2021.
- RATHEESH, G.; VENUGOPAL, J. R.; CHINAPPAN, A.; EZHILARASU, H. et al. 3D Fabrication of Polymeric Scaffolds for Regenerative Therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3, n. 7, p. 1175-1194, 2017/07/10 2017.
- RAVI, M.; PARAMESH, V.; KAVIYA, S. R.; ANURADHA, E. et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*, 230, n. 1, p. 16-26, Jan 2015.
- RAWN, D. F. K.; HALLDORSON, T. H. J.; WOYCHUK, R. N.; MUIR, D. C. G. Pesticides in the Red River and its Tributaries in Southern Manitoba: 1993—95. *Water Quality Research Journal*, 34, n. 2, p. 183-220, 1999.

- REDDY, T. P.; MANCZAK, M.; CALKINS, M. J.; MAO, P. et al. Toxicity of neurons treated with herbicides and neuroprotection by mitochondria-targeted antioxidant SS31. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, n. 1, p. 203-221, Jan 2011.
- RIZZI, J. S.; SELOTO, D. G.; PEREIRA, L. C. Mitochondrial injury induced by triclopyr in the rat liver. *Drug and Chemical Toxicology*, p. 1-12.
- RODRIGUES, E. T.; ALPENDURADA, M. F.; GUIMARÃES, A.; AVÓ, R. et al. The environmental condition of an estuarine ecosystem disturbed by pesticides. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26, n. 23, p. 24075-24087, Aug 2019.
- ROUSSELLE, D. C. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) - Final version of the opinion on decamethylcyclopentasiloxane (cyclopentasiloxane, D5) in cosmetic products. *Regul Toxicol Pharmacol*, 83, p. 117-118, Feb 2017.
- SAHLIN, S.; ÅGERSTRAND, M. Decamethylcyclopentasiloxane (D5). EQS data overview. Stockholm University, Stockholm. The Department of Environmental Science and Analytical Chemistry (ACES). 2018.
- SALIMI, M.; ESRAFILI, A.; GHOLAMI, M.; JONIDI JAFARI, A. et al. Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP technologies. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189, n. 8, p. 414, 2017/07/24 2017.
- SALINAS-VERA, Y. M.; VALDÉS, J.; PÉREZ-NAVARRO, Y.; MANDUJANO-LAZARO, G. et al. Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. *Front Oncol*, 12, p. 826113, 2022.
- SAMAL, K.; MAHAPATRA, S.; HIBZUR ALI, M. Pharmaceutical wastewater as Emerging Contaminants (EC): Treatment technologies, impact on environment and human health. *Energy Nexus*, 6, p. 100076, 2022/06/16/ 2022.
- SAMALI, A.; NORDGREN, H.; ZHIVOTOVSKY, B.; PETERSON, E. et al. A Comparative Study of Apoptosis and Necrosis in HepG2 Cells: Oxidant-Induced Caspase Inactivation Leads to Necrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255, n. 1, p. 6-11, 1999/02/05/ 1999.
- SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8, n. 1, p. 15, 2014/02/26 2014.
- SENSEMAN, S. A.; ARMBRUST, K. Herbicide handbook. 9th ed ed. Lawrence, KS: Weed Science Society Of America, 2007. 1891276565; 9781891276569.
- SEWELL, F.; ALEXANDER-WHITE, C.; BRESCIA, S.; CURRIE, R. A. et al. New approach methodologies (NAMs): identifying and overcoming hurdles to accelerated adoption. *Toxicol Res (Camb)*, 13, n. 2, p. tfae044, Apr 2024.
- SHAH, D. D.; RAGHANI, N. R.; CHORAWALA, M. R.; SINGH, S. et al. Harnessing three-dimensional (3D) cell culture models for pulmonary infections: State of the art and future directions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396, n. 11, p. 2861-2880, 2023/11/01 2023.
- SHORT, P.; COLBORN, T. Pesticide use in the U.S. and policy implications: a focus on herbicides. *Toxicol Ind Health*, 15, n. 1-2, p. 240-275, Jan-Mar 1999.
- SIDDIQUI, M. A.; AHMAD, J.; FARSHORI, N. N.; SAQUIB, Q. et al. Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Mol Cell Biochem*, 384, n. 1-2, p. 59-69, Dec 2013.
- SMETANA, K. Cell biology of hydrogels. *Biomaterials*, 14, n. 14, p. 1046-1050, 1993/11/01/ 1993.
- SUN, M.; LIU, A.; YANG, X.; GONG, J. et al. 3D Cell Culture—Can it be as Popular as 2D Cell Culture? *Advanced NanoBiomed Research*, 1, 02/01 2021.
- SUTER-DICK, L.; ALVES, P. M.; BLAAUBOER, B. J.; BREMM, K. D. et al. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem Cells Dev*, 24, n. 11, p. 1284-1296, Jun 1 2015.

- SUVARCHALA, G.; PHILIP, G. H. Toxicity of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, n. 15, p. 15515-15523, Aug 2016.
- SZETO, S. Y. Determination of kinetics of hydrolysis by high-pressure liquid chromatography: Application to hydrolysis of the ethylene glycol butyl ether ester of triclopyr. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, n. 7, p. 1118-1121, 1993/07/01 1993.
- TEMPLE, J.; VELLIU, E.; SHEHATA, M.; LÉVY, R. Current strategies with implementation of three-dimensional cell culture: the challenge of quantification. *Interface Focus*, 12, n. 5, p. 20220019, Oct 6 2022.
- TIMBRELL, J. A.; MARRS, T. C. Biotransformation of Xenobiotics. In: *General, Applied and Systems Toxicology*, 2009.
- TIMCHALK, C.; FINCO, D. R.; QUAST, J. F. Evaluation of Renal Function in Rhesus Monkeys and Comparison to Beagle Dogs Following Oral Administration of the Organic Acid Triclopyr (3,5,6-Trichloro-2-pyridinyloxyacetic Acid). *Fundamental and Applied Toxicology*, 36, n. 1, p. 47-53, 1997/03/01/ 1997.
- TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. *Current Biology*, 27, n. 21, p. R1147-R1151, 2017/11/06/ 2017.
- VALOT, L.; MARTINEZ, J.; MEHDI, A.; SUBRA, G. Chemical insights into biopinks for 3D printing. *Chemical Society Reviews*, 48, n. 15, p. 4049-4086, 2019. 10.1039/C7CS00718C.
- VARGAS-VALDERRAMA, A.; MESSINA, A.; MITJAVILA-GARCIA, M. T.; GUENOU, H. The endothelium, a key actor in organ development and hPSC-derived organoid vascularization. *Journal of Biomedical Science*, 27, n. 1, p. 67, 2020/05/22 2020.
- VELICOGNA, J.; RITCHIE, E.; PRINCZ, J.; LESSARD, M.-E. et al. Ecotoxicity of siloxane D5 in soil. *Chemosphere*, 87, n. 1, p. 77-83, 2012/03/01/ 2012.
- WANG, D. G.; NORWOOD, W.; ALAEE, M.; BYER, J. D. et al. Review of recent advances in research on the toxicity, detection, occurrence and fate of cyclic volatile methyl siloxanes in the environment. *Chemosphere*, 93, n. 5, p. 711-725, Oct 2013.
- WANG, H.; XU, T.; YIN, D. Emerging trends in the methodology of environmental toxicology: 3D cell culture and its applications. *Science of The Total Environment*, 857, p. 159501, 2023/01/20/ 2023.
- WARNER, N. A.; EVENSET, A.; CHRISTENSEN, G.; GABRIELSEN, G. W. et al. Volatile Siloxanes in the European Arctic: Assessment of Sources and Spatial Distribution. *Environmental Science & Technology*, 44, n. 19, p. 7705-7710, 2010/10/01 2010.
- WILKEN, R. L.; IMANALIEVA, A.; MACAVOY, S.; CONNAUGHTON, V. P. Anatomical and Behavioral Assessment of Larval Zebrafish (*Danio rerio*) Reared in Anacostia River Water Samples. *Arch Environ Contam Toxicol*, 78, n. 4, p. 525-535, May 2020.
- XIANG, Y.; MILLER, K.; GUAN, J.; KIRATITANAPORN, W. et al. 3D bioprinting of complex tissues in vitro: state-of-the-art and future perspectives. *Archives of Toxicology*, 96, n. 3, p. 691-710, Mar 2022.
- XUE, X.; JIA, H.; XUE, J. Bioaccumulation of Methyl Siloxanes in Common Carp (*Cyprinus carpio*) and in an Estuarine Food Web in Northeastern China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 76, 04/01 2019.
- YI, D.; KIM, K.; LEE, M.; JUNG, E.-m. et al. Effects of Maternal Exposure to Decamethylcyclopentasiloxane on the Alternations in Offspring Behaviors in Mice. *Biomedicines*, 11, n. 1, p. 35, 2023.
- YU, J.; PARK, S. A.; KIM, W. D.; HA, T. et al. Current Advances in 3D Bioprinting Technology and Its Applications for Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*, 12, n. 12, Dec 11 2020.

YUE, S.; CHEN, S.; ZHANG, Y.; CHEN, B. et al. Emerging threat of environmental microplastics: A comprehensive analysis of hepatic metabolic dysregulation and hepatocellular damage (Review). *Int J Mol Med*, 56, n. 4, Oct 2025.

ZENKER, A.; CICERO, M. R.; PRESTINACI, F.; BOTTONI, P. et al. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 133, p. 378-387, 2014/01/15/ 2014.

ZHANG, H.; SHAO, X.; ZHAO, H.; LI, X. et al. Integration of Metabolomics and Lipidomics Reveals Metabolic Mechanisms of Triclosan-Induced Toxicity in Human Hepatocytes. *Environmental Science & Technology*, 53, n. 9, p. 5406-5415, 2019/05/07 2019.

ZHANG, J.; FALANY, J. L.; XIE, X.; FALANY, C. N. Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by dimethylcyclodioxanes. *Chem Biol Interact*, 124, n. 2, p. 133-147, Jan 15 2000.