

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

**Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana
reconstruída *in vitro*: aplicabilidade na engenharia tecidual**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

**São Paulo
2022**

JENIFFER FARIAS DOS SANTOS

**Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana
reconstruída *in vitro*: aplicabilidade na engenharia tecidual**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Profa. Dra. Viviane Abreu Nunes

Versão original.

**São Paulo
2022**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Farias dos Santos, Jeniffer

Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana reconstruída in vitro: aplicabilidade na engenharia tecidual / Jeniffer Farias dos Santos; orientadora Viviane Abreu Nunes. -- São Paulo, 2022.

147 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. modelo de pele humana 3D in vitro. 3. substitutos dérmicos. 4. biomateriais. 5. cicatrização. I. Abreu Nunes, Viviane, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): **Jeniffer Farias dos Santos**

Título da Tese: **Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana reconstruída *in vitro*: aplicabilidade na engenharia tecidual**

Orientador(a): **Profa. Dra. Viviane Abreu Nunes Cerqueira Dantas**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da tese de doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

USP - ESCOLA DE ARTES,
CIÊNCIAS E HUMANIDADES
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - EACH/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana reconstruída in vitro: aplicabilidade na engenharia tecidual

Pesquisador: JENIFFER FARIAS DOS SANTOS

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 38532920.1.0000.5390

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.351.554

Apresentação do Projeto:

Partindo da premissa que uma importante fonte de células tronco mesenquimais (CTM) é representada pelo cordão umbilical humano e que a coleta dessas células envolve um procedimento simples, seguro e indolor, que depende somente do consentimento materno, o que constitui uma vantagem frente a outras fontes de células-tronco adultas, essa pesquisa quantitativa abordará o cultivo das CTM do cordão umbilical sobre substitutos dérmicos visando modelos tridimensionais da epiderme. Além da terapia clínica, o desenvolvimento de protocolos eficientes para diferenciação de células-tronco em queratinócitos, em modelos tridimensionais in vitro, poderá fornecer ferramentas úteis para o estudo da biologia da pele, teste de drogas e cosméticos, como resultar em estratégias terapêuticas, embasadas na engenharia de tecidos, para pacientes com queimaduras (Mohd Hilmi e Halim, 2015; Arno et al., 2011). As CTM que serão utilizadas nesse estudo já encontram-se armazenadas em banco de células do grupo de pesquisa. Os dados relacionados à atividade das enzimas, bem como os resultados obtidos serão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por ANOVA, mais o teste de Tukey para comparações múltiplas. Na microscopia será avaliada a morfologia das células, sua disposição tridimensional e estratificação epidérmica. Espera-se que as células-tronco induzidas à diferenciação e estratificação epidermal, apresentem as quatro camadas epidérmicas: basal,

Endereço: Av. Arlindo Béttio, nº 1000

Bairro: Ermelino Matarazzo

CEP: 03.828-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-1048

E-mail: cep-each@usp.br

USP - ESCOLA DE ARTES,
CIÊNCIAS E HUMANIDADES
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - EACH/USP



Continuação do Parecer: 4.351.554

espinhosa, granulosa e córnea.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

- Avaliar o uso de células-tronco mesenquimais em modelo de pele humano reconstruída in vitro, analisando seu potencial de diferenciação e estratificação epidérmica.

Objetivos secundários

- Avaliar a diferenciação epidérmica tridimensional de células-tronco mesenquimais (CTM) usando colágeno e scaffolds como equivalentes dérmicos;

- analisar a morfologia das células, sua disposição tridimensional e estratificação epidérmica, quando cultivadas sobre os suportes biomiméticos;

- estudar a expressão de marcadores epidérmicos (como CQ10, CQ14, p63 e involucrina) durante a diferenciação das CTM em queratinócitos;

- verificar a presença da atividade enzimática de calicreínas teciduais epidérmicas 5, 6 e 7 nos modelos propostos, em diferentes períodos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos.

Não há, pois a pesquisa será realizada com células in vitro.

Benefícios

Não há, pois a pesquisa será realizada com células in vitro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a área de Biotecnologia e Dermatologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos exigidos foram inseridos na Plataforma Brasil.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Não haverá necessidade de aplicação do TCLE, pois a pesquisa será realizada com células tronco

Endereço: Av. Arlindo Béttio, nº 1000

Bairro: Ermelino Matarazzo

CEP: 03.828-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-1048

E-mail: cep-each@usp.br

USP - ESCOLA DE ARTES,
CIÊNCIAS E HUMANIDADES
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - EACH/USP



Continuação do Parecer: 4.351.554

armazenadas em banco de células.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1539945.pdf	16/09/2020 11:47:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_de_ausencia_TCLE_Jeniffer_2020.pdf	16/09/2020 11:43:18	JENIFFER FARIAS DOS SANTOS	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	CARTA_PROTOCOLO_PESQUISA_Jeniffer.pdf	16/09/2020 11:28:18	JENIFFER FARIAS DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Jeniffer_final2020.pdf	16/09/2020 11:25:32	JENIFFER FARIAS DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_JenifferFarias_CEP.pdf	16/09/2020 10:55:19	JENIFFER FARIAS DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Outubro de 2020

Assinado por:
Rosa Yuka Sato Chubaci
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Arlindo Béttio, nº 1000
Bairro: Ermelino Matarazzo CEP: 03.828-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-1048 E-mail: cep-each@usp.br

Dedicatória

*Ao meu pai, Matias Santos, que sempre
acreditou em meu potencial e incentivou minha
vida acadêmica.*

*Ao meu marido, Eliomar Fiuza, por todo
companheirismo, paciência e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me guiado, me dado forças para enfrentar todos os desafios, e por sempre estar ao meu lado.

À Prof^a Dr^a Viviane Abreu Nunes por tudo e por tanto. A pessoa que me ensinou a manusear as pipetas, e a filosofar sobre as células e sobre a vida. Aprendi tanto com ela, que essa tese seria apenas um pequeno capítulo da nossa história. Vivi é minha fonte de inspiração, sinônimo de dedicação, inteligência, competência, alegria e cumplicidade. Em meus momentos de angústia, sempre esteve ao meu lado, acreditando em meu potencial. Quero te agradecer por todas palavras de incentivo, e por me ensinar com tanto carinho e zelo. Por me acolher, e por acreditar nesse projeto. Que outros alunos possam ter a mesma sorte que eu tive ao ter uma orientação como a sua. Serei eternamente grata por tudo, e um dia espero te deixar tão orgulhosa, como o orgulho que sinto em tê-la como minha orientadora.

Ao Prof. Felipe Chambergo por ter me apresentado a vida científica e por me acolher como filha. Obrigada por toda dedicação, ensinamentos, inúmeras assinaturas em ofícios, e por todo incentivo. Ao meu padrinho científico, todo meu agradecimento e carinho.

Aos meus pais, Eunice Farias e Matias Santos, por serem meu porto seguro e fortaleza. Por me incentivarem e não medirem esforços para ver meu sonho se realizar. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Ao meu marido, Eliomar Fiuza, que acompanhou minha trajetória científica desde meu ingresso à USP. Obrigada por sempre me ouvir e se interessar pelo mundo da biologia celular e molecular. Poder conversar contigo sobre todos os assuntos possíveis foi, e é, um dos maiores motivos para eu me apaixonar por você todos os dias. Obrigada pelo carinho e amor, e por ser meu ombro amigo. Obrigada por sonhar meus sonhos, que agora são nossos. Te amo para sempre.

À Profª Drª Silvy Stuchi Maria-Engler, por todo conhecimento e acolhimento durante minha tese. Obrigada por ensinar o modelo de pele 3D da Universidade de São Paulo, e por disponibilizar seu tempo para discussões tão enriquecedoras à minha vida acadêmica. Sem a senhora, seria quase impossível a realização deste trabalho.

Agradeço também à Silvia Romano, por me ensinar o passo-a-passo da pele 3D, e por evidenciar que os mínimos detalhes fazem toda a diferença. Ao grupo do Laboratório de Citopatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em especial às meninas Larissa Carvalho, Cláudia Larissa, Julia Bagatin, meu muito obrigada.

À Profª Drª Maria de Fátima Raposo e ao Prof. Paulo Ribeiro, por me acolherem no doutorado sanduíche, pelos aprendizados, carinho, e por fazerem de Portugal meu segundo lar.

Ao Prof. Jorge Carvalho Silva por me ensinar sobre *electrospinning*, resazurina, MEV e FITR, por me inspirar como professor e por ser minha referência em engenharia tecidual.

Ao Prof. Luismar Marques Porto, por aceitar minha proposta de doutorado sanduíche empresarial, e por fazer discussões tão pertinentes com nossos resultados, sempre com muito zelo e boa energia.

À Drª. Fernanda Vieira Berti, pela orientação, dedicação, acolhimento e aprendizado. Obrigada por me apresentar cantinhos tão lindos em Florianópolis, e por me fazer ficar apaixonada pela natureza e pela vida. Nossos momentos de convívio valeram por muitos anos e sinto que, ainda, tenho muito a aprender e conviver contigo.

Ao professor Alexandre Bruni-Cardoso e seus alunos, em especial ao Antônio, por toda a ajuda com as imunofluorescências. Obrigada a técnica Célia por todo apoio.

Aos meus queridos amigos e amigas do laboratório, em especial a Brisa, Bruna, Vandy, Sammy Pacco, Myrian, Gustavo, Willian, Victória, Nathália Ruder e Rafael, por tornarem meus dias no trabalho tão felizes e cheios de café.

Aos meus amigos portugueses, Filipa Pires, Ana, Pipa, Inês, Gonçalo, Diana Querido, Bruno Guerreiro, Daniela Fernandes, Lúgia, Roberto, e a minha amiga brasileira que conheci em Portugal, Mariana Rossi, por tanto carinho e momentos inesquecíveis.

À Janaina de Andrea Dernowsek, por me ensinar não somente sobre biomanufatura aditiva, mas também em como acreditar e batalhar por um sonho.

Aos meus amigos Quantis, Daniela Tiepo, Laura Rebouças, Williane Siqueira e Diego Rodney, por me ensinarem o que é um trabalho em equipe de excelência. Pelas risadas e momentos de alegria.

À Carla Mergel, por sempre lembrar do nosso laboratório nas doações do Butantan, e pelas nossas conversas tão confortantes.

Agradeço à Denisse Camarena, por me ensinar a fazer os cortes histológicos.

Agradeço à Helena Malerba, por me ensinar a utilizar o criostato.

Agradeço ao técnico Walter Turato, pelo apoio nos PCR *Arrays*.

A todos os funcionários da EACH-USP, em especial ao Clarino Vieira, por cuidar do nosso laboratório.

Ao meu irmão Diego e cunhada Tatiane, por sempre estarem ao meu lado. Aos meus sobrinhos, Leonardo e Isabella, por serem minha fonte de felicidade.

À minha melhor amiga e irmã Sarah Ingrid Farias por me oferecer a melhor companhia e ombro amigo que eu poderia ter.

À minha amiga Érika por sua lealdade e carinho.

À minha família Farias e Santos por todo amor, e aos meus avós por sempre orarem à Deus por mim.

Aos meus sogros pelo cuidado e carinho.

Aos meus amigos que chegaram e se foram. Por me fazerem entender que a vida é feita de ciclos, mas que as lembranças boas sempre devem permanecer.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

À Universidade de São Paulo e Universidade Nova de Lisboa pela oportunidade de realização do doutorado e pela infraestrutura.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação interunidades em Biotecnologia da USP, Fábria e Eliane, e à secretária da Faculdade de Ciência e Tecnologia da UNL, Ana Cruz, pela ajuda e instruções.

Às pessoas que aqui não estão citadas, mas que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho, mesmo que indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

Nenhuma conquista tem significado pleno, se não for partilhada com as pessoas que nos ajudaram durante o caminho (Chiara Lubich)

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, que financiou a bolsa de doutorado regular N.41050/2019-5; e de doutorado sanduíche empresarial N.302030/2020-4.

O doutorado sanduíche foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo N. 88887.152230/2017-00.

O projeto de pesquisa teve financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo N. 2019/11963-0.

“Lembre-se de Deus em tudo o que fizer e Ele lhe mostrará o caminho certo”

(Pv 3:6)

“Bem-aventurado o homem que encontra sabedoria e adquire conhecimento”

(Pv. 3:13)

RESUMO

SANTOS, J. F. **Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana reconstruída in vitro**: aplicabilidade na engenharia tecidual. 2022. 146f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A epiderme, camada mais superficial da pele, é composta por queratinócitos, que proliferam na camada basal e, à medida que são impelidos para as camadas mais superficiais, se diferenciam e expressam proteínas estrato-específicas. Em caso de traumas na pele, a homeostase epidérmica é afetada, sendo necessárias abordagens clínicas para seu restabelecimento. A engenharia tecidual é uma importante estratégia para a regeneração da pele, sendo o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) do cordão umbilical, interessante na terapia celular. Esse projeto avaliou o potencial de transdiferenciação das CTM do cordão umbilical em queratinócitos em modelos tridimensionais (3D) de pele *in vitro*, utilizando os equivalentes dérmicos: i) colágeno tipo I e fibroblastos dérmicos, ii) matriz descelularizada, iii) *scaffold* comercial, iv) tela absorvível comercial. Foi investigada a expressão das proteínas epidermais CQ5, CQ10, involucrina e filagrina, por imunofluorescência e PCR em tempo real, além da atividade das KLK na hidrólise de substratos fluorogênicos. Também foram investigados, por PCR *Array*, genes envolvidos na cicatrização, expressos em modelos de pele 3D com CTM, além de sua modulação no caso de ferida na pele. Os resultados, apesar de não indicarem uma epiderme tipicamente estratificada, mostraram expressão dos marcadores CQ5, CQ10, involucrina e filagrina, bem como o aumento da atividade de KLK nos equivalentes epidérmicos constituídos de CTM, em todos substitutos dérmicos usados, indicando comprometimento das CTM induzidas com a transdiferenciação epidermal. A análise dos genes colágeno I, III, XIV, além de IGF-1 e TGF- β 3, expressos por CTM em modelos de pele 3D sugere seu envolvimento na fase de remodelamento do processo cicatricial. Os modelos propostos, tanto para investigar a transdiferenciação epidermal das CTM, como seu envolvimento no processo de cicatrização, indicam sua aplicabilidade para uso na pesquisa com vistas ao seu aprimoramento e exploração em estratégias de medicina regenerativa.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais (CTM), modelo de pele 3D, substitutos dérmicos, biomateriais, cicatrização.

ABSTRACT

SANTOS, J. F. **Mesenchymal stem cells in an in vitro reconstructed human skin model**: applicability in tissue engineering. 2022. 146f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2022.

The epidermis, the most superficial layer of the skin, is composed of keratinocytes, which proliferate in the basal layer and, as they are pushed to the more superficial layers, differentiate and express stratum-specific proteins. In case of skin trauma, epidermal homeostasis is affected, requiring clinical approaches to restore it. Tissue engineering is an important strategy for skin regeneration, and the use of mesenchymal stem cells (MSC) from the umbilical cord is interesting in cell therapy. This project evaluated the transdifferentiation potential of umbilical cord MSCs into keratinocytes in three-dimensional (3D) skin models in vitro, using the dermal equivalents: i) type I collagen and dermal fibroblasts, ii) decellularized matrix, iii) commercial scaffold, iv) commercial absorbable mesh. The expression of epidermal proteins cytokeratin 5, 14 and 10, involucrin and filaggrin was investigated by immunofluorescence and/or real-time PCR, in addition to the activity of KLK in the hydrolysis of fluorogenic substrates. Genes involved in healing, expressed in 3D skin models with MSC, were also investigated by array PCR, in addition to their modulation in the skin wounds cases. The results, despite not indicating a typically stratified epidermis, showed expression of epidermal markers CK5, CK14, CK10, involucrin and filaggrin, as well as increased KLK activity in the epidermal equivalents made up of MSC, in all dermal substitutes used, indicating impairment of induced MSC with epidermal transdifferentiation. The analysis of collagen I, III, XIV genes, in addition to IGF-1 and TGF- β 3, expressed by MSC in 3D skin models, suggests their involvement in the remodeling phase of the healing process. The proposed models, both to investigate the epidermal transdifferentiation of MSC, and their involvement in the healing process, indicate their applicability for use in research with a view to their improvement and exploration in regenerative medicine strategies.

Keywords: mesenchymal stem cells (MSC), 3D skin model, dermal substitutes, biomaterials, wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Camadas da pele. A pele é constituída, essencialmente, por três camadas:
 1) Epiderme – camada externa que está em contato direto com o ambiente; 2)
 Derme – camada interna; 3) Tela subcutânea – camada que está sob a derme. 1
- Figura 2 - Estrutura da epiderme. A epiderme é constituída por quatro estratos: basal, espinhoso, granuloso e córneo. No estrato basal, são expressas as CQ5 e CQ14, enquanto que no estrato espinhoso, encontram-se as CQ1 e CQ10. No estrato granuloso, as células apresentam grânulos queratoalinos que contêm filagrina, involucrina e loricina, além da expressão das calicreínas KLK5, KLK6 e KLK7. O estrato córneo representa a primeira linha de barreira da pele, sendo constituído por células anucleadas chamadas de corneócitos. Nesse estrato, verifica-se a presença de filagrina.3
- Figura 3 - Organograma geral das vertentes investigadas nesse projeto.12
- Figura 4 – Modelo experimental para estabelecimento de epiderme estratificada utilizando colágeno I e fibroblastos como suporte dérmico. Após gelatinização do *plug* de colágeno, as CTM ou queratinócitos foram cultivados durante 1 ou 10 dias em diferentes meios. Após esse período, as células foram expostas à IAL por diferentes períodos.19
- Figura 5 – Modelo experimental para estabelecimento de epiderme estratificada utilizando CellFate® como suporte dérmico.....20
- Figura 6 – Esquema de montagem das peles nos grupos “sem ferida” e “com ferida” para análise de expressão gênica por PCR Array – Wound healing.....27
- Figura 7 - Esquema do processo de electrospinning para confecção dos *scaffolds*. Deposição dupla dos polímeros sintético (PCL) e natural (gelatina de peixe) pelo processo de eletrofiação horizontal.....29
- Figura 8 - Morfologia das CTM do cordão umbilical após 7 dias de descongelamento. (A) As células apresentaram-se como uma população com forma fibroblastoide, (B) com núcleo e nucléolos evidentes (setas amarelas). Aumento de 50 x em (A) e 400 x em (B).....31
- Figura 9 - Imunofenotipagem das CTM por citometria de fluxo. Histogramas e *Density Plots* mostram as células marcadas positivamente para (A) anti-CD105-PE, (B) anti-CD73-PE, (C) anti-CD44-FITC, (D) anti-CD29-PE e (E) anti-CD90-PE, que

são antígenos de superfície expressos em CTM; e negativamente para (F) anti-CD34-PerCP e (G) anti-CD31-PE, antígenos de superfície presentes em células-tronco hematopoiéticas e endoteliais, respectivamente, não expressos em CTM. O pico em azul refere-se às células não marcadas (controle) incubadas somente com o anticorpo secundário conjugado com o mesmo fluoróforo do anticorpo específico.32

Figura 10 - Diferenciação das CTM em adipócitos. Após 21 dias, CTM meio específico para diferenciação adipogênica foram coradas com corante Oil Red, tendo os lipídios intracelulares marcados (setas amarelas) nas células diferenciadas (B), sendo os mesmos ausentes no controle (A). Aumento de 100 x.35

Figura 11 - Diferenciação das CTM em condrócitos. Em células cultivadas durante 21 dias em meio específico para diferenciação condrogênica apresentaram morfologia mais arredondada, aumento do conteúdo nuclear em relação ao citoplasma, além do enfileiramento, visualizados em fibras cartilaginosas (B). Essas mudanças não foram observadas no controle (A). Aumento de 50 x em (A) e 100 x em (B).36

Figura 12 - Diferenciação das CTM em osteócitos. Células cultivadas em meio específico para diferenciação osteogênica durante 21 dias, apresentaram calcificações extracelulares identificada pela presença de fosfato de cálcio na matriz extracelular (setas pretas). evidenciada pela coloração de Von Kossa (B). No controle, essas calcificações não foram identificadas (A). Aumento de 100 x em (A) e 200 x em (B).36

Figura 13 - Fotomicrografia de CTM induzidas a diferenciação epidermal sobre equivalente dérmico. Queratinócitos basais cultivados por 1 dia em KGM (A e B) foram usados como controle positivo para epiderme estratificada. As CTM cultivadas, previamente, em DL10 foram cultivadas sobre equivalente dérmico composto por colágeno e fibroblastos (setas pretas) por 1 dia, em meio para cultivo de queratinócitos KGM (C e D), KSFM (E e F) ou KGM/KSFM 1:1 (G e H), ou meio de proliferação DL10 (I e J). Após 1 dia de cultivo imerso, as células foram expostas a IAL por 10 dias em meio RAFT. As CTM apresentaram fenótipo de tecido conjuntivo frouxo (setas amarelas), além da presença de vacúolos (setas vermelhas), característicos de tecido adiposo, em todas as potenciais epidermes formadas. A epiderme controle obtida a partir de queratinócitos basais apresentaram todas as camadas epidérmicas (CB, CE, CG, CC). Coloração de

hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A, C, E, G, I) e 200 x (B, D, F, H, J). Seta preta: fibroblastos; Seta amarela: matriz extracelular; Seta vermelha: tecido esponjoso; E: epiderme; D: derme; CB: camada basal; CE: camada espinhosa; CG: camada granulosa; CC: camada córnea.....38

Figura 14 - Fotomicrografia das CTM pré-cultivadas em KSFM por 4 dias e induzidas à diferenciação epidermal sobre o equivalente dérmico. As CTM foram cultivadas sobre o equivalente dérmico de colágeno com fibroblastos por 1 dia, em meio KGM (A e B) ou KSFM (C e D). Após 1 dia de imersão, as células foram expostas à IAL por 10 dias. Observa-se grande quantidade de matriz extracelular (setas amarelas), principalmente nas amostras constituídas por CTM induzidas à diferenciação com meio KGM. Ainda, em algumas regiões, observa-se a presença de vacúolos não corados (setas vermelhas), que dão aspecto esponjoso ao tecido. Coloração de Hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A, C, E, G) e 200 x (B, D, F, H). D: derme.40

Figura 15 - Fotomicrografia das CTM induzidas à diferenciação epidermal sobre equivalente dérmico com 10 dias de período de imersão. As CTM foram cultivadas sobre o equivalente dérmico de colágeno com fibroblastos durante 10 dias em meio KGM (C e D), KSFM (E e F), RAFT (G e H) ou DL10/KSFM (I e J). Queratinócitos basais cultivados imersos por 1 dia em KGM (A e B) foram usados como controle positivo. Após o período de imersão, as células foram expostas à IAL por 10 dias. As CTM induzidas à diferenciação epidérmica apresentaram fenótipo típico de tecido conjuntivo frouxo, grande produção de matriz extracelular (setas amarelas), além da presença de vacúolos não corados (setas vermelhas). Ainda, as CTM cultivadas em KSFM proliferaram em direção ao equivalente dérmico. Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 200 x (A, C, E, G, I, K) e 400 x (B, D, F, H, J, L).....43

Figura 16 - Expressão de CQ10 por imunofluorescência nas epidermes formadas sobre equivalente dérmico de colágeno e fibroblastos. Após 10 dias de exposição em IAL, as CTM cultivadas no período de imersão em meio KGM (C), KSFM (D), RAFT (E) e DL10/KSFM (F) apresentaram discreta marcação para CQ10, que não é observada em CTM cultivadas em meio de proliferação DL10 (B). Essa proteína é expressa nos estratos suprabasais da epiderme formada por queratinócitos (A). Aumento de 200 x.45

- Figura 17 - Separação manual da epiderme e derme (controle positivo). Após 10 dias de exposição à IAL, a epiderme (seta amarela), caracterizada por uma película transparente, foi separada da derme (seta vermelha), manualmente, com auxílio de uma pinça, para análises posteriores.....46
- Figura 18 - Atividade de KLK5, KLK6 e KLK7 na epiderme e derme. A atividade enzimática de KLK5 (A), KLK6 (B) e KLK7 (C) foi detectada na hidrólise de substratos FRET pelas proteínas presentes nos extratos de epiderme (queratinócitos basais) e derme (fibroblastos), em diferentes períodos (4, 7, 10 dias) de IAL. De modo geral, a atividade de KLK na epiderme foi superior à derme. As diferenças foram analisadas por ANOVA + pós-teste de Bonferroni e consideradas estatisticamente diferentes com $\rho < 0,05$ (*), $\rho < 0,01$ (**) e $\rho < 0,001$ (***), quando comparadas à derme no mesmo período de cultivo. UAF: unidade arbitrária de fluorescência; ptn: proteína;47
- Figura 19 - Caracterização da atividade de KLK5 e KLK7 com o uso de inibidores. A caracterização da atividade de KLK5 (A) e KLK7 (B) foi realizada por meio de detecção de sua atividade residual na presença dos inibidores SBTI e aprotinina para KLK5 e TPCK para KLK7. Controle: CTM cultivadas bidimensionalmente em KSFM por 11 dias. KLK: calicreína tecidual; SBTI: Inibidor de tripsina de soja; TPCK: tosil-fenilalanil-clorometil cetona.48
- Figura 20 - Atividade de KLK5, KLK6 e KLK7 nas CTM induzidas à diferenciação epidérmica após 1 ou 10 dias de imersão. As CTM foram cultivadas por 1 (A, C e E) ou 10 (B, D, e F) dias em diferentes meios de diferenciação ou DL10 e expostas à IAL por 10 dias. A atividade enzimática de KLK5 (A e B), KLK6 (C e D) e KLK7 (E e F) nos extratos celulares foi determinada na hidrólise de seus respectivos substratos. Epi CTR: epiderme controle formada a partir de queratinócitos basais. ns: sem diferença significativa. $\rho < 0,05$ (*), comparada ao controle. KLK: calicreína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; min: minuto; ptn: proteína. .49
- Figura 21 - Expressão de CQ14 em peles formadas por CTM e células 2D. As CTM foram cultivadas em meio DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias (A). CTM, fibroblastos e queratinócitos mantidos em meio para cultura 2D também foram analisados, assim como pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às células cultivadas em DL10 no primeiro dia. (*) Diferente em relação à pele CTM DL10 no mesmo período de

- cultivo ($\rho < 0,05$). (\$\$) Diferente em relação ao dia 4. ns: sem diferença significativa.51
- Figura 22 - Expressão de CQ10 em peles formadas por CTM e células 2D. (A) CTM cultivadas em DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias. (B) CTM, fibroblastos e queratinócitos cultivados em 2D e pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às peles com CTM cultivadas em DL10 no primeiro dia. (**) Diferente em relação ao DL10 no mesmo período de cultivo ($\rho < 0,01$). (\$\$\$) Diferente em relação a pele CTM DL10 dia 4 ($\rho < 0,001$).....52
- Figura 23 - Expressão de involucrina em peles formadas por CTM e células 2D. (A) Peles com CTM cultivadas em DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias em IAL. (B) CTM, fibroblastos e queratinócitos cultivados em 2D, e pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às peles com CTM cultivadas em DL10 no primeiro dia. (***) Diferente em relação a pele CTM DL10 no mesmo período de cultivo ($\rho < 0,001$); (\$\$\$) Diferente em relação a pele CTM DL10 dia 4 ($\rho < 0,001$).53
- Figura 24 - Expressão de filagrina em peles formadas por CTM e em células cultivadas em 2D. (A) CTM cultivadas em DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias. (B) CTM, fibroblastos e queratinócitos cultivados em 2D e pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às peles com CTM cultivadas em DL10 no primeiro dia. (*) Diferente em relação ao DL10 no mesmo período de cultivo ($\rho < 0,01$).....54
- Figura 25 - Fotografia das peles com CTM sobre colágeno ou MatriXpec™ após 1 dia de imersão. As CTM foram cultivadas como equivalente epidérmico (linha tracejada) sobre o colágeno ou MatriXpec™, e induzidas ou não à diferenciação em DL10 ou KGM/RAFT, respectivamente. É possível observar grande contração do MatriXpec™ quando as CTM são cultivadas sobre ele em DL10 (seta amarela), fenômeno não identificado quando essas células são cultivadas em KGM/RAFT sobre o mesmo suporte (seta preta).55
- Figura 26 - Fotomicrografia das CTM cultivadas como equivalente epidérmico sobre matriz de colágeno ou MatriXpec™. Após 10 dias de IAL, as CTM cultivadas sobre equivalente dérmico composto por colágeno (A e B) ou MatriXpec™ (C e D) em DL10 (A e C) ou KGM/RAFT (C e D). De maneira geral, as células apresentaram

fenótipo típico de tecido conjuntivo frouxo. Ainda, as CTM cultivadas em DL10 sobre o MatriXpec™ migraram/proliferaram em direção a esse equivalente dérmico (C), diferentemente de quando são cultivadas sobre o colágeno (A). Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 200 x.56

Figura 27 - Expressão de CQ5 detectada por imunofluorescência nas epidermes formadas a partir de cultivo de CTM sobre equivalente dérmico. (A) CTM cultivadas em DL10 em matriz de colágeno; (B) CTM induzidas à diferenciação em matriz de colágeno; (C) CTM cultivadas em DL10 em MatriXpec™; (D) CTM induzidas à diferenciação em MatriXpec™. Aumento de 200 x.57

Figura 28 - Expressão de CQ10 detectada por imunofluorescência nas epidermes formadas a partir de cultivo CTM sobre equivalente dérmico. (A) CTM cultivadas em DL10 em matriz de colágeno; (B) CTM induzidas à diferenciação em matriz de colágeno; (C) CTM cultivadas em DL10 em MatriXpec™; (D) CTM induzidas à diferenciação em MatriXpec™. Aumento de 200 x.58

Figura 29 - Expressão de involucrina detectada por imunofluorescência nas epidermes formadas a partir cultivo de CTM sobre equivalente dérmico. (A) CTM cultivadas em DL10 em matriz de colágeno; (B) CTM induzidas à diferenciação em matriz de colágeno; (C) CTM cultivadas em DL10 em MatriXpec™; (D) CTM induzidas à diferenciação em MatriXpec™. Aumento de 200 x.59

Figura 30 - Atividade de KLK5 e KLK7 nas CTM induzidas à diferenciação epidérmica sobre colágeno ou MatriXpec™. Atividade enzimática de (A) KLK5 e (B) KLK7 determinada na hidrólise de seus respectivos substratos, em CTM cultivadas sobre o equivalente dérmico de colágeno ou MatriXpec™. $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) Diferença comparada à CTM cultivadas com DL10 sobre o mesmo suporte dérmico. KLK: calicreína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; min: minuto; ptn: proteína.....60

Figura 31 - Fotomicrografia dos queratinócitos cultivados sobre a matriz CellFate® ou transwell. (A) Queratinócitos basais cultivados sobre o CellFate® (A/B) ou sobre o transwell (C/D) em meio de diferenciação e expostos à IAL por 10 dias. Em ambos suportes, as células foram capazes proliferar e formar uma estrutura estratificada, apresentando as camadas: basal (setas roxas), espinhosa (setas laranjas), granulosa (setas amarelas) e córnea (setas azuis). Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A e C) e 200 x (B e D).61

Figura 32 - Fotomicrografia das CTM cultivadas sobre a matriz CellFate®. CTM cultivadas em meio de proliferação (A/B) ou diferenciação (C/D) e expostas à IAL durante 10 dias. As CTM cultivadas em meio de proliferação apresentaram características de tecido conjuntivo (B, setas pretas), com células dispersas em matriz extracelular, e foram capazes de contrair a matriz (A, seta vermelha). Quando induzidas à diferenciação, as CTM secretaram matriz extracelular típica de diferenciação osteogênica nas extremidades (D, setas cinzas) ou apresentaram-se com núcleos alongados e organizadas em feixes multiparalelos (1D, setas verdes). Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A, C) e 200 x (B, D).63

Figura 33 - Expressão de CQ10 por imunofluorescência em equivalentes epidérmicos cultivados sobre o CellFate® ou transwell. (A) CTM cultivadas sobre o CellFate® em meio de proliferação ou (B) diferenciação e expostas à IAL por 10 dias. (C) Queratinócitos cultivados sobre o CellFate(r) ou (D) transwell, em modelo de RHE. Linha pontilhada: delimitação entre camada basal e suprabasal. Setas brancas: queratinócitos negativos para CQ10. Aumento de 100 x (A, B) e 200 x (C, D).64

Figura 34 - Atividade de KLK 5 e KLK7 nos extratos das CTM cultivadas sobre o CellFate® ou transwell. As CTM foram cultivadas por 10 dias em IAL em DL10 ou RAFT sobre a matriz CellFate® ou sobre a membrana polimérica transwell. A atividade enzimática de (A) KLK5 e (B) KLK7 presente nos extratos celulares foi determinada na hidrólise de seus respectivos substratos. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes com $p < 0,001$ (***) , comparadas ao cultivo em DL10 ou RAFT no mesmo período, e $p < 0,001$ (\$\$\$), $p < 0,01$ (\$\$) ou $p < 0,05$ (\$) quando comparadas ao cultivo sobre o CellFate® ou transwell no mesmo período. KLK: calicreína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; min: minuto.65

Figura 35 - Fotomicrografias das CTM cultivadas sobre a matriz Integra® em DL10. CTM foram cultivadas por 1 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias em IAL em DL10 (controle negativo). Marcação azul: núcleos celulares. Linha tracejada: delimitação da matriz dérmica. Setas brancas: proliferação celular acima da matriz. Aumento de 100 x.67

- Figura 36 - Fotomicrografias das CTM cultivadas sobre a matriz Integra® em KSFM. CTM foram induzidas à diferenciação epidermal pelo cultivo em KSFM por 1 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias em IAL. Marcação azul: núcleos celulares corados com o corante Hoesch 33342. Linha tracejada: delimitação da matriz dérmica. Setas brancas: migração/proliferação celular em direção ao equivalente dérmico. IAL: interface ar-líquido. Aumento de 100 x.....68
- Figura 37 - Atividade de KLK 5, KLK6 e KLK7 nos extratos das CTM cultivadas sobre a matriz Integra®. A atividade enzimática de (A) KLK5, (B) KLK6 e (C) KLK7 foi quantificada nas CTM cultivadas por até 11 dias em DL10 ou KSFM. Estatisticamente significativo para (***) $\rho < 0,001$ e (**) $\rho < 0,01$, comparadas ao cultivo em DL10 no mesmo período. KLK: calicreína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; ptn: proteína.69
- Figura 38 - Genes envolvidos na cicatrização modulados nas peles contendo CTM induzidas à diferenciação, com ou sem ferida. Após 10 dias de IAL, ou 6 dias de exposição à ferida, as CTM cultivadas em RAFT foram avaliadas quanto seu perfil de expressão de genes envolvidos na cicatrização, comparadas a pele controle.72
- Figura 39 - Genes envolvidos no processo cicatrização modulados nas peles contendo CTM não induzidas à diferenciação, com ou sem ferida. Após 10 dias de IAL, ou 6 dias de exposição à ferida, as CTM cultivadas em DL10 foram avaliadas quanto seu perfil de expressão de genes envolvidos na cicatrização, comparadas a pele controle.73
- Figura 40 - Genes envolvidos no processo cicatrização modulados nas peles contendo CTM induzidas ou não à diferenciação epidermal, com ou sem ferida. Após 10 dias de IAL, ou 6 dias de exposição à ferida, as CTM cultivadas em RAFT foram avaliadas quanto seu perfil de expressão de genes envolvidos na cicatrização, comparadas as CTM cultivadas em DL10.....74
- Figura 41 - Genes modulados no processo cicatrização quando as peles contendo CTM ou queratinócitos são feridas.....75
- Figura 42 - Imagens de MEV das fibras de PCL/gelatina produzidas pelo processo de electrospinning. Morfologia das fibras antes (A) e após (B) o processo de reticulação com vapor de GTA 5%.....76
- Figura 43 - Viabilidade após exposição das células com os extratos de PCL/gelatina. Células HFFF2 foram incubadas com o extrato dos *scaffolds*, em diferentes

concentrações (100, 50 e 25%), por 24 e 72 h. Os dados estão expressos em termos da média \pm EP (n = 3).77

Figura 44 - Imagens de MEV dos *scaffolds* com as células. Fibroblastos dérmicos HFFF2 cultivados sobre *scaffolds* de PCL/gelatina por 3 dias, identificados por projeções eletrodensas sobre as nanofibras (setas brancas). Aumento de 500 x (A) e 2000 x (B).78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos marcadores de superfície utilizados para imunofenotipagem das CTM por citometria de fluxo.	15
Tabela 2 – Meios de cultura usados durante período de imersão das células distribuídas sobre os equivalentes dérmicos. Após confecção do equivalente dérmico (colágeno e fibroblastos), as CTM ou queratinócitos basais foram cultivados durante 1 ou 10 dias nos meios KGM/RAFT (1:1), KSFM/RAFT (1:1), KGM/KSFM/RAFT (1:1:2), RAFT, DMEM/KSFM (1:1). EGF: fator de crescimento epidermal; CaCl ₂ : cloreto de cálcio; BPE: extrato de pituitária bovina;	18
Tabela 3 – Anticorpos usados na imunofluorescência (IF) com suas respectivas especificações e diluições.....	22
Tabela 4 – Calicreínas teciduais epidérmicas (KLK) e seus respectivos substratos FRET.....	24
Tabela 5 – Sequência dos oligonucleotídeos para CQ10, CQ14, involucrina, filagrina e GAPDH	25
Tabela 6 - Caracterização da citotoxicidade dos <i>scaffolds</i> em função da viabilidade celular relativa	30
Tabela 7 - Espessura da epiderme potencialmente formada a partir de CTM cultivadas em IAL após 1 d de imersão	41
Tabela 8 - Espessura da epiderme potencialmente formada a partir de CTM cultivadas em IAL após 10 d de imersão	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz - Ácido o-aminobenzóico

ANOVA – Análise de variância

CQ - citoqueratina(s)

CTM - células-tronco mesenquimais

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindol

DL10 – meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino

DMEM - meio de cultura celular, do Inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico

EP - erro padrão

EDDnp - N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EGF - fator de crescimento epidermal, do Inglês *Epidermal Growth Factor*

FITC - isotiocianato de fluoresceína, do Inglês *fluorescein isothiocyanate*

EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal

FRET - do Inglês, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

KLK- calicreína tecidual

h – hora(s)

HEPES - ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanossulfônico

IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina

IAL – interface ar-líquido

IF - imunofluorescência

KGM – meio de crescimento de queratinócitos, do Inglês *Keratinocyte Growth Medium*

KSFM - meio de cultura para queratinócitos livre de soro, do Inglês *Keratinocyte serum-free medium*

min – minuto(s)

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MEC - matriz extracelular

PBS - tampão salina fostato, do Inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCL - policaprolactona

PE – ficoeritrina

PerCP - complexo peridina-clorofila-proteína

PFA - *p*-formaldeído

RNA – ácido ribonucleico

SCCE –enzima do tipo quimotripsina do estrato córneo, do Inglês, *Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme*

SCTE – enzima do tipo tripsina do estrato córneo, do Inglês, *Stratum Corneum Tryptic Enzyme*)

SITC - Sociedade Internacional de Terapia Celular

SFB - soro fetal bovino

TA – Temperatura ambiente

TB - tampão de bloqueio

Abreviaturas dos aminoácidos

A - Alanina

F - Fenilalanina

K - Lisina

L - Leucina

Q - Glutamina

R - Arginina

S - Serina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3.1 Manutenção da cultura celular	14
3.2 Caracterização das células isoladas do cordão umbilical	14
3.2.1 Imunofenotipagem.....	14
3.2.2 Diferenciação em tecidos de origem mesenquimal	16
3.2.2.1 <i>Diferenciação adipogênica</i>	16
3.2.2.2 <i>Diferenciação osteogênica</i>	16
3.2.2.3 <i>Diferenciação condrogênica</i>	17
3.3 Diferenciação das CTM em queratinócitos em modelo 3D de pele humana reconstruída <i>in vitro</i> com diferentes suportes dérmicos	17
3.3.1 Colágeno e fibroblastos.....	17
3.3.2 Matriz descelularizada MatriXpec™	19
3.3.3 Scaffold CellFate®.....	19
3.3.4 Tela absorvível Integra®	20
3.4 Análises histológicas por microscopia ótica	21
3.4.1 Colágeno e fibroblastos, matriz descelularizada MatriXpec™ e scaffold CellFate®.....	21
3.4.2 Tela absorvível Integra®	21
3.5 Imunofluorescência	22
3.6 Verificação da atividade de enzimas envolvidas na diferenciação	23
3.7 Análise da expressão de proteínas	24
3.7.1 Extração do RNA e produção da fita de DNA complementar	24
3.7.2 PCR quantitativo em tempo real.....	24
3.8 Ensaio de cicatrização	25
3.8.1 Estabelecimento de modelo 3D simplificado de ferida	26
3.8.2 Investigação dos genes envolvidos no processo cicatricial.....	26
3.9 Confeção e caracterização de <i>scaffold</i> polimérico para engenharia tecidual	27
3.9.1 Eletrofiação	28
3.9.2 Análise da Citotoxicidade	28

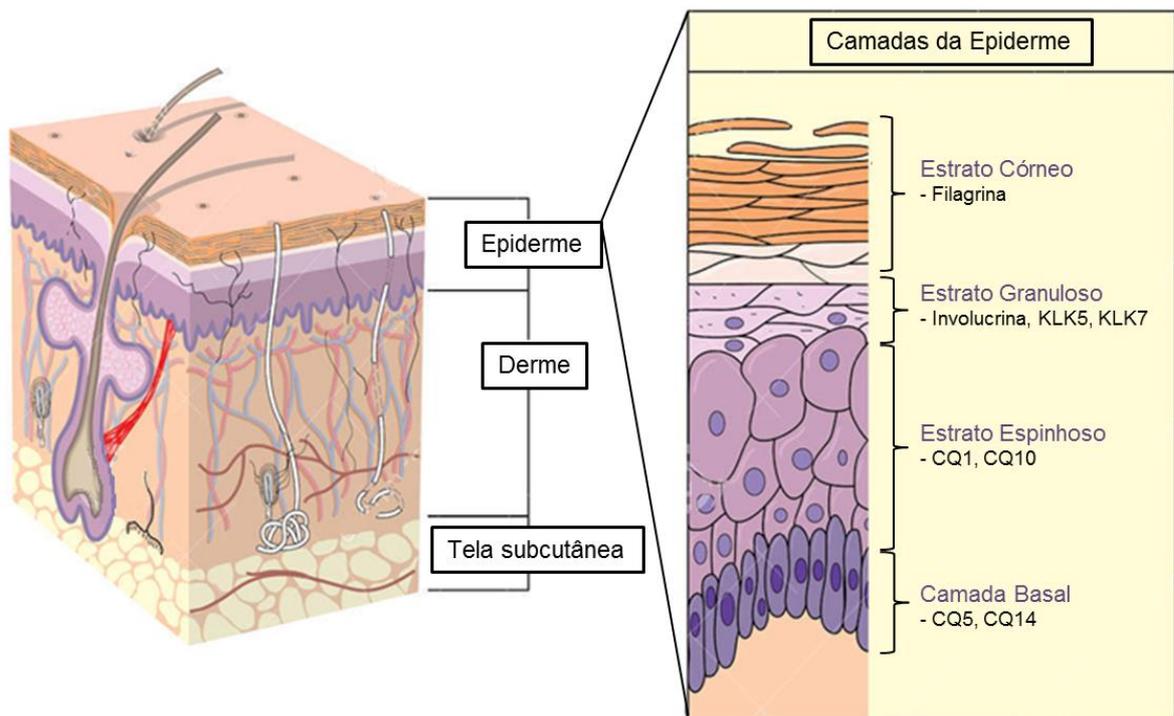
3.9.3	Análises por Microscopia de Varredura nos Scaffolds	30
3.10	Análise dos resultados	30
4.1	Cultivo das CTM.....	31
4.2	Caracterização das CTM por imunofenotipagem.....	31
4.3	Indução da diferenciação das CTM em distintos tipos celulares.....	34
4.3.1	Diferenciação adipogênica	35
4.3.2	Diferenciação condrogênica	35
4.3.3	Diferenciação osteogênica	36
4.4	Diferenciação epidermal das CTM sobre equivalentes dérmicos	37
4.4.1	Colágeno e fibroblastos	37
4.4.1.1	<i>Análise Histológica</i>	<i>37</i>
4.4.1.2	<i>Imunofluorescência para CQ10.....</i>	<i>44</i>
4.4.1.3	<i>Atividade enzimática de calicreínas teciduais</i>	<i>46</i>
4.4.1.4	<i>Expressão de proteínas epidérmicas</i>	<i>50</i>
4.4.2	Matrix descelularizada MatriXpec™	55
4.4.2.1	<i>Análise histológica.....</i>	<i>56</i>
4.4.2.2	<i>Imunofluorescência para CQ5, CQ10 e involucrina</i>	<i>57</i>
4.4.2.3	<i>Atividade enzimática de calicreínas teciduais</i>	<i>59</i>
4.4.3	Scaffold de nanocelulose CellFate®.....	61
4.4.3.1	<i>Análise histológica.....</i>	<i>61</i>
4.4.3.2	<i>Imunofluorescência para CQ10.....</i>	<i>63</i>
4.4.3.3	<i>Avaliação da atividade de calicreínas teciduais</i>	<i>64</i>
4.4.4	Tela absorvível Integra®	66
4.4.4.1	<i>Análise histológica.....</i>	<i>66</i>
4.4.4.2	<i>Atividade enzimática de calicreínas teciduais</i>	<i>69</i>
4.5	Investigação dos genes expressos por CTM no processo de cicatrização	70
4.6	Caracterização de scaffolds como suporte dérmico.....	76
4.6.1	Morfologia das fibras produzidas por eletrofiação	76
4.6.2	Análise da Citotoxicidade	77
4.6.3	Análises por Microscopia de Varredura nos Scaffolds	77
5.	DISCUSSÃO	79
6.	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS.....	93

APÊNDICE A	106
APÊNDICE B	107
APÊNDICE C	108
APÊNDICE D	112

1. INTRODUÇÃO

A pele é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida, e forma uma interface de autorrenovação e auto-reparação entre o organismo e o ambiente, protegendo-o contra danos mecânicos, químicos, osmóticos e térmicos, além de fornecer uma barreira eficaz contra a invasão microbiana (DAȔBROWSKA; MIELCAREK; NOWAK, 2018). Ela é constituída essencialmente, por três camadas: epiderme, derme e tela subcutânea (**Figura 1**).

Figura 1 - Camadas da pele. A pele é constituída, essencialmente, por três camadas: 1) Epiderme – camada externa que está em contato direto com o ambiente; 2) Derme – camada interna; 3) Tela subcutânea – camada que está sob a derme.



Fonte: Adaptado de <http://www.mayoclinic.org/basic-skin-layers/img-20006377>.

A epiderme é a camada externa que está em contato direto com o meio ambiente. Ela é formada por um arranjo ordenado de células denominadas queratinócitos, que se dispõem em estratos ou camadas, as quais, de dentro para fora, recebem os nomes de germinativa ou basal, espinhosa, granulosa e córnea (TEZUKA; TAKAHASHI; KATSUNUMA, 1992).

Na camada basal, os queratinócitos proliferam continuamente enquanto não iniciam o processo de diferenciação. Ao iniciarem o processo de diferenciação terminal, essas células passam por mudanças morfológicas e bioquímicas à medida que são impelidas, sucessivamente, para as camadas mais superficiais pela produção de novas células (ECKERT; CRISH; ROBINSON, 1997).

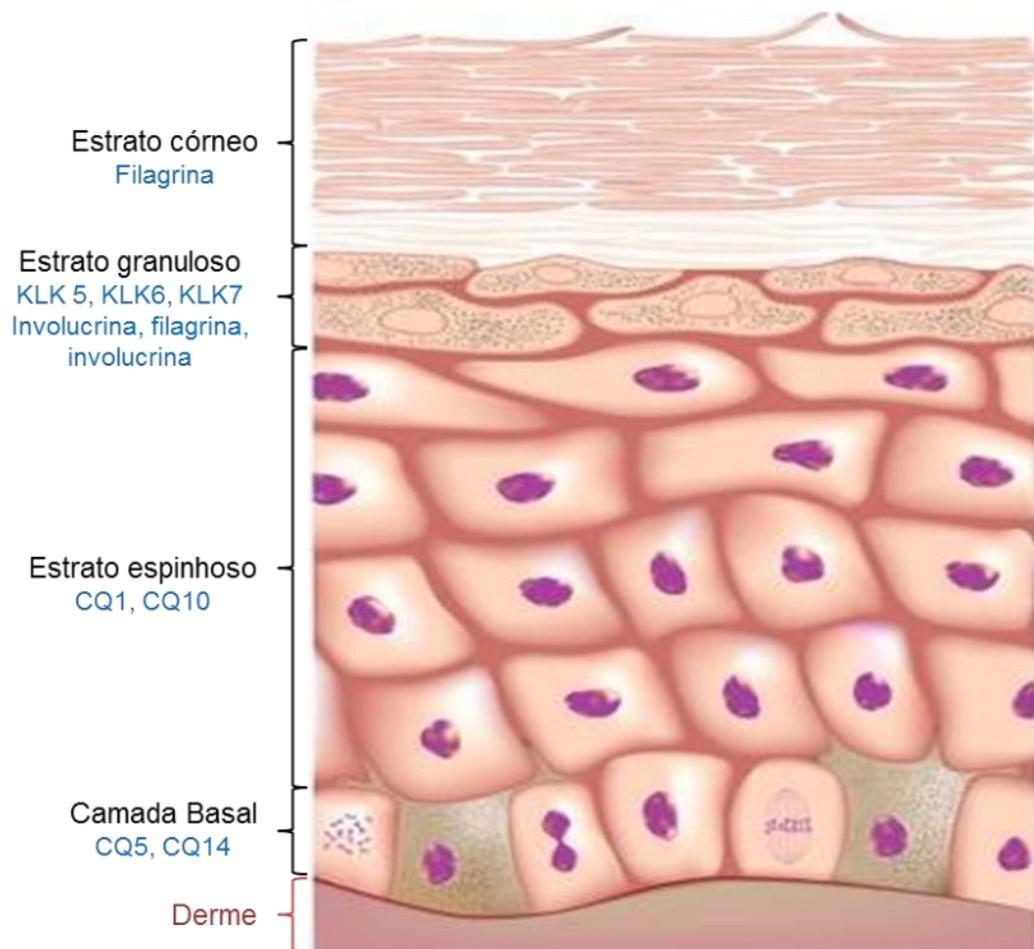
Ao deixarem a camada basal, as células passam a se conectar por estruturas de adesão chamadas de desmossomos, que conferem resistência mecânica à pele e dão um aspecto espinhoso à região, formando a camada espinhosa. Acima dessa camada está a camada granulosa, na qual os queratinócitos possuem formato retangular com citoplasma contendo grânulos de querato-hialina, precursores da queratina que irão compor a camada córnea. Estima-se que a epiderme humana se renove de 15 a 30 dias (KOSTER; ROOP, 2007).

Durante a diferenciação terminal, os queratinócitos expressam diferentes tipos de proteínas, dentre elas, a involucrina, a filagrina e as citoqueratinas (CQ) (RAWLINGS et al., 1994). As CQ apresentam distribuição específica para cada estrato da epiderme, o que permite serem utilizadas como marcadores de diferenciação (POLAKOWSKA; HERTING, GOLDSMITH, 1991; HUANG et al., 2016). Enquanto as CQ5 e CQ14 são expressas na camada basal, as CQ1 e CQ10 aparecem na camada espinhosa (**Figura 2**), o que indica o início do processo de diferenciação (POLAKOWSKA, HERTING, GOLDSMITH et al., 1991; CANDI et al., 2002; MASRI et al., 2022). As maiores mudanças ocorrem durante a transição das células da camada granulosa para a córnea.

A camada córnea é composta por células totalmente diferenciadas, os corneócitos, em que a ação combinada de diferentes enzimas resulta na perda do núcleo e de outras organelas, restando apenas uma rede complexa de proteínas e lipídeos. Embora os eventos moleculares envolvidos na perda do núcleo e nas alterações morfológicas observadas nos queratinócitos ainda não sejam completamente compreendidos, sabe-se que há uma intensa atividade proteolítica nesse processo (SANTOS et al., 2019).

A involucrina é a mais comum, se não obrigatória, proteína do envelope cornificado. Ela possui vários resíduos de glutamina (Q) que participam na formação de ligações isopeptídicas covalentes (RICE; GREEN, 1979). Sua expressão se dá no início do estrato espinhoso e se mantém até o granuloso.

Figura 2 - Estrutura da epiderme. A epiderme é constituída por quatro estratos: basal, espinhoso, granuloso e córneo. No estrato basal, são expressas as CQ5 e CQ14, enquanto que no estrato espinhoso, encontram-se as CQ1 e CQ10. No estrato granuloso, as células apresentam grânulos queratoalinos que contém filagrina, involucrina e loricrina, além da expressão das calicreínas KLK5, KLK6 e KLK7. O estrato córneo representa a primeira linha de barreira da pele, sendo constituído por células anucleadas chamadas de corneócitos. Nesse estrato, verifica-se a presença de filagrina.



Fonte: Adaptado de https://www.123rf.com/photo_17432855_epidermis-of-the-skin.html

Além da involucrina, a filagrina também é muito importante no processo de diferenciação terminal das células, pois está diretamente envolvida na integridade da barreira cutânea. Monômeros de filagrina participam na organização das lamelas que formarão a camada córnea, de modo que fiquem paralelamente compactadas e auxiliem na manutenção da homeostase da pele (CARDILI et al., 2013).

Além dessas proteínas, nas camadas mais superficiais da epiderme, há uma família de enzimas que compreende as calicreínas teciduais (KLK), as quais estão envolvidas na descamação da pele. As calicreínas mais ativas na pele são a KLK7

ou SCCE (do Inglês, Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme) e a KLK5 ou SCTE (do Inglês, Stratum Corneum Tryptic Enzyme) (BRATTSAND et al., 2005; KOMATSU et al., 2005; KOMATSU et al., 2007), e são responsáveis por clivar as proteínas que compõem os corneodesmosomos (SIMON et al., 2001; CAUBET et al., 2004; NAUROY; NYSTRÖM, 2019).

A expressão de KLK5 e KLK7 está restrita à camada granulosa da epiderme saudável. Essas enzimas são encontradas nos grânulos lamelares que liberam os seus conteúdos para o espaço extracelular, na interface entre os estratos granuloso e córneo. Sua expressão está associada ao processo de cornificação (ISHIDA-YAMAMOTO et al., 2004; NAUROY; NYSTRÖM., 2019).

No processo de diferenciação epidérmica, todas essas proteínas são expressas de maneira orquestrada até que ocorra a descamação das camadas mais superficiais da epiderme. Além disso, é essencial que o processo de proliferação dos queratinócitos esteja em equilíbrio com a descamação da camada córnea (HUANG et al., 2016). Contudo, em determinadas condições patológicas ou traumas da pele, como é o caso de queimaduras, a dinâmica entre os processos de proliferação e diferenciação epidérmica é afetada, podendo ocorrer perda da funcionalidade da pele. Ainda, em casos de traumas graves, nos quais as regiões mais profundas da derme são atingidas, um distúrbio no processo de cicatrização pode requerer um tempo maior para o fechamento da ferida, ou levar a cicatrizes excessivas resultando em uma pele com características diferentes da saudável (PHILIPS et al., 2016; SORG et al., 2017).

A cicatrização de feridas envolve quatro fases distintas, mas que se sobrepõem entre si, sendo elas: hemostática, inflamatória, proliferativa e remodelação tecidual. De maneira geral, na fase hemostática, as células sanguíneas impedem a perda de sangue no local da lesão, e liberam uma variedade de fatores que atraem neutrófilos para o local, iniciando a fase inflamatória. Os neutrófilos, além de outras células do sistema imune, migram para o local da lesão, protegendo-a contra a invasão de patógenos, além de auxiliar no recrutamento de células cutâneas que promoverão o reparo tecidual. Nessa fase, chamada proliferativa, ocorre produção de matriz extracelular (MEC), que contribuirá para o fechamento da ferida. Por fim, o colágeno produzido na MEC amadurece, na chamada fase de remodelamento, e o local da ferida começa a assemelhar-se à pele saudável. Todas as fases requerem a coordenação funcional entre diferentes tipos de células, sejam

elas epidérmicas, dérmicas, endoteliais e imunes, para garantir o sucesso no processo de restauração tecidual (BALBINO et al., 2005; HAN; CEILLEY, 2017).

Uma das feridas de pele mais frequente no mundo são as queimaduras. Estima-se que 180.000 mortes a cada ano sejam causadas por queimaduras e, quando não fatais, elas são uma das principais causas de morbidade que incluem hospitalização prolongada (OMS, 2018). Em 2004, quase 11 milhões de pessoas no mundo sofreram queimaduras a ponto de necessitarem de atenção médica (OMS, 2018). Entre os anos de 2008 a 2014, houve 129.858 casos de internações no Sistema Único de Saúde por queimaduras (CITRON et al., 2018). As manifestações físicas, psicológicas e psicossociais decorrentes da gravidade da queimadura podem comprometer a qualidade de vida dos pacientes no curto e longo prazo, sendo um importante problema de saúde pública (WASIAK et al., 2014; ECHEVARRÍA-GUANILO et al., 2016).

Atualmente, a engenharia de tecidos tem sido importante aliada no tratamento de queimaduras graves, tanto para incorporar substitutos de pele, como para propor adjuvantes que acelerem a reconstituição epidérmica (NOURIAN DEHKORDI et al., 2019). Em muitos casos, são usados enxertos de pele, especialmente quando as vítimas sofrem de graves lesões que causam danos permanentes à pele. Enxertos da própria vítima ou aloenxertos também são utilizados para acelerar o processo de cicatrização. No entanto, os mecanismos de cicatrização das feridas após o transplante do aloenxerto não estão bem caracterizados (BOYCE et al., 2002; CALOMENO et al., 2015), além de não serem, necessariamente, eficientes. Ainda, o uso de autoenxertos pode não ser viável em casos de pacientes muito debilitados e com extensas áreas comprometidas, limitando seu uso clínico (CHUA et al., 2016).

Adicionalmente à estratégia de transplante de pele obtidas de outros indivíduos ou do próprio paciente, queratinócitos primários têm sido utilizados em modelos *in vitro* visando seu uso na engenharia tecidual nos casos de queimaduras (COOLEN et al., 2007; ILJAS et al., 2021). Eles podem ser isolados de diversas fontes, porém, sua limitada capacidade proliferativa e de expansão *in vitro*, além de baixo rendimento no processo de isolamento no caso de células precursoras epidérmicas, aponta para a necessidade do uso de outras fontes celulares.

Nesse contexto, emergem as células-tronco, cujo potencial de autorrenovação e a capacidade de originar linhagens celulares com diferentes

funções têm impulsionado pesquisas sobre as aplicações terapêuticas dessas células (NUNES et al., 2009; NUNES et al., 2007; NUNES; ZATZ, 2006; SANTOS et al., 2019; ZATZ; NUNES; ZATZ, 2005).

Uma importante fonte de células-tronco é representada pelo cordão umbilical humano (WANG et al., 2004; SANTOS et al., 2019), formado por componentes hematopoiéticos e mesenquimais (CTM). A coleta dessas células envolve um procedimento simples, seguro e indolor, dependendo apenas do consentimento materno, o que constitui uma vantagem frente a outras fontes de células-tronco adultas. Especificamente, as células-tronco do cordão são imunologicamente mais imaturas do que de outras fontes, ocasionando, por exemplo, menor frequência de doença do enxerto contra hospedeiro, principal complicação pós-transplante de medula entre não-aparentados idênticos ou parcialmente idênticos (GLUCKMAN; ROCHA, 2004; MARTIN-PIEDRA et al., 2019).

Estudos envolvendo a exploração das potencialidades de CTM do cordão umbilical mostraram que essas células são capazes de se diferenciar em tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários, ou seja, endoderma, mesoderma e ectoderma (NUNES et al., 2007; SANTOS et al., 2019; STEFAŃSKA et al., 2020).

O transplante de células-tronco para o tratamento de doenças tem-se mostrado bem sucedido, pois, além de sua propriedade pouco imunogênica (LIN; HOGAN, 2011), as sinalizações e secreções parácrinas das CTM proporcionam um microambiente que estimula a regulação da inflamação, reparação e regeneração de lesões (KIM et al., 2016). Na pele, os efeitos parácrinos das CTM também têm sido associados à melhora na migração e proliferação de fibroblastos, macrófagos, queratinócitos e células endoteliais, além de promover a angiogênese em feridas (RUSTAD et al., 2012).

Em relação à transdiferenciação das CTM em células da pele, em 2013, Bishai et al. (2013) Demonstraram que as CTM desse tecido, quando comparadas às outras fontes disponíveis, além de apresentarem maior potencial para a transdiferenciação, de maneira geral, podem se transdiferenciar em células epidérmicas, corroborando os dados obtidos por Martin-Piedra et al. (2019), tanto *in vitro* quando *in vivo*.

Em 2015, Chen et al. Evidenciaram a transdiferenciação *in vitro* das CTM do cordão umbilical em queratinócitos, ao utilizarem biomateriais de colágeno e quitosano como suportes dérmicos. No modelo proposto, apesar de ser verificada a expressão de CQ19 e de involucrina, não fica claro, histologicamente, se ocorre estratificação da

epiderme a partir de CTM. Ainda assim, *in vivo*, esse arcabouço melhorou a regeneração de feridas, fornecendo resultados promissores para a medicina regenerativa.

Schneider et al. (2010) utilizaram CTM da geleia de Wharton do cordão umbilical tratadas com ácido ou 5-azacitidina, sobre equivalentes dérmicos constituídos por colágeno I/III e fibroblastos, como um possível modelo tridimensional (3D) de pele. Os autores observaram que, apesar de ser observada expressão de pan-citoqueratina, a transdiferenciação não foi acompanhada por mudanças morfológicas características de queratinócitos nem pela expressão de outros marcadores epidermais.

Nosso grupo já demonstrou que as CTM do cordão umbilical podem se diferenciar em queratinócitos, após cultivo bidimensional em meio contendo fator de crescimento epidermal (EGF), em um processo temporalmente similar ao que ocorre na pele humana. Durante o processo de diferenciação, verificou-se a expressão das CQ5, 10 e 14, e da involucrina, proteínas marcadoras da diferenciação epidermal, bem como a atividade enzimática das calicreínas teciduais, existentes nas camadas mais diferenciadas da epiderme (SANTOS et al., 2019).

Também já foi demonstrado que CTM derivadas da medula óssea se diferenciam em queratinócitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, o que foi avaliado por meio da presença de diversas proteínas expressas em queratinócitos. Essas células, além da capacidade de se transdiferenciar, recrutaram outros queratinócitos por meio da sinalização de diferentes quimiocinas, auxiliando na reparação de feridas na pele (SASAKI, et al., 2008; LI et al., 2015).

Nessa mesma linha, também foi mostrado que CTM do tecido adiposo, quando co-cultivadas com queratinócitos humanos ou com meio condicionado obtido de queratinócitos, passaram a expressar marcadores de queratinócitos como involucrina, CQ5 e 10 (CHAVEZ-MUNOZ et al., 2013). Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que as células-tronco obtidas de lipoaspirato de cirurgias possuem a capacidade de se transdiferenciar em células do tipo queratinócito (KLC – do inglês, “keratinocyte-like cells”), podendo formar uma epiderme estratificada. Outro estudo evidenciou que, após serem injetadas no tecido subcutâneo de camundongos, CTM derivadas do tecido adiposo migraram para a pele, e se diferenciaram em KLC, sugerindo que o microambiente é fundamental para o comportamento que as células adotam (LIN et al., 2013; PAGANELLI et al., 2019).

Apesar de muitos avanços no uso das CTM, mais especificamente das provenientes do cordão umbilical, para o estabelecimento de modelos 3D de epiderme, os resultados ainda são controversos ou insuficientes para reproduzirem um modelo epidérmico funcional (SCHNEIDER ET AL., 2010; CHEN et al., 2015) que garanta a função de barreira, apresente características fenotípicas de uma epiderme humana, na qual as proteínas marcadoras da diferenciação sejam expressas em uma relação temporal similar à que ocorre *in vivo*.

Para entender melhor como o microambiente pode afetar o processo de diferenciação das células epidérmicas, vários métodos têm sido utilizados, sendo um deles o modelo animal. Apesar disso, em 11 de novembro de 2015, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA – publicou no Diário Oficial da União nº 215, seção 3, resolução que obriga fabricantes de cosméticos e laboratórios farmacêuticos a empregarem métodos alternativos à utilização de animais na pesquisa. Portanto, o uso de animais na pesquisa tende a ser substituído, gradualmente, por modelos *in vitro*.

Modelos 3D *in vitro*, ao contrário, têm ganhado grande destaque na bioengenharia tecidual, pois mimetizam as características arquitetônicas, o comportamento e fenótipo celular como um tecido (LAI, CHENG; KISAALITA, 2012).

O modelo 3D de pele mais antigo, e ainda utilizado, é representado por queratinócitos co-cultivados com um equivalente dérmico constituído por colágeno e fibroblastos, em uma interface ar-líquido (IAL), a qual permite a estratificação dos queratinócitos em um processo similar ao que acontece na pele humana (PRUNIERAS; REGNIER; WOODLEY, 1983; CARLSON et al., 2008). A cultura dos queratinócitos nessa interface faz com que as células estejam expostas ao oxigênio, diferenciando-se completamente. Prunieras, Regnier e Woodley (1983) sugerem que essa exposição aumente a morfogênese epidérmica e a síntese de grânulos queratohialinos.

Recentemente, a MEC que dá o suporte à diferenciação dos queratinócitos também vem sendo mimetizada por polímeros biodegradáveis chamados *scaffolds*. Estudos demonstraram que *scaffolds* são capazes de criar um microambiente favorável à regeneração, promover a remodelação do tecido, além de atuar como um modelo que induz a reparação funcional da pele, osso, coração, pulmão, dentre outros órgãos (YI et al., 2016).

Como substitutos dérmicos, o desenvolvimento de *scaffolds* para uso clínico devem levar em consideração algumas características, como: ser aderentes, ter porosidade entre 60 e 90% para permitir passagem de nutrientes e metabólitos, apresentar diâmetro mínimo de 20 μm em seus poros para permitir a invasão de fibroblastos, exibir baixa toxicidade, permitir a evaporação de água de forma semelhante à pele, ser flexíveis, fáceis de armazenar e usar, além de ter baixo custo (GOMES, 2013).

Alguns estudos têm proposto o uso de CTM cultivadas em *scaffolds* para tratamento de doenças dermatológicas (TAM et al., 2014; STEFFENS et al., 2015; XIE et al., 2016). Tam et al. (2014), ao cultivar CTM do cordão umbilical sobre *nanoscaffolds* (*scaffolds* produzidos com fibras de 50-500 nm de diâmetro) de policaprolactona com aloe vera, mostraram que as células passaram a expressar proteínas específicas de queratinócitos, além de outras que auxiliam na cicatrização de feridas, quando submetidas à transdiferenciação. Em relação à associação do *nanoscaffold* com CTM de cordão umbilical *in vivo*, os mesmos autores mostraram os efeitos benéficos na cicatrização da pele, sugerindo seu uso em feridas de pacientes diabéticos (TAM et al., 2014).

Trabalho recente também mostrou que CTM de polpa de dente, co-cultivadas com queratinócitos humanos, aderiram sobre *scaffolds* de ácido poli-DL-láctico (PDLLA), o qual representa um biomaterial eficiente na medicina regenerativa (STEFFENS et al., 2015). Porém, as CTM de polpa de dente são de difícil isolamento e obtenção quando comparadas às do cordão umbilical.

Apesar desses resultados promissores, os tratamentos com os *scaffolds* hoje disponíveis são insuficientes para promover a recuperação dos pacientes, especialmente em casos de grandes queimaduras e feridas crônicas (MIDDELKOOP et al., 2004; STEFFENS et al., 2015).

Algumas empresas têm se dedicado à produção de *scaffolds* poliméricos que possam ser utilizados na engenharia tecidual. Uma delas é a empresa Biocelltis Biotecnologia S/A, que atua no desenvolvimento de biomateriais e produtos a um estágio em que eles possam ser licenciados para parceiros comerciais de áreas terapêuticas específicas. A empresa possui expertise na produção de biomateriais, arcabouços teciduais, neuro-engenharia e uma infinidade de plataformas de engenharia de tecidos que vão desde a produção de matrizes 3D para cultura de células tronco, embrionárias, e endoteliais, à matrizes de regeneração dérmica para

terapia celular, produzida de forma personalizada para cada paciente, fazendo uso da própria célula do paciente. Um de seus produtos mais conhecidos são as matrizes 3D CellFate®, biomateriais compostos por nanofibras poliméricas naturais de 50 a 100 nm de diâmetro, biocompatíveis, estéreis, prontas para uso, ideais para cultivar células humanas e animais em laboratório (BIOCELLTIS).

Outra empresa especializada na produção de insumos para cultura 3D é a TissueLabs. Ela desenvolve e comercializa insumos, equipamentos e serviços na área de fabricação de órgãos e tecidos em laboratório. Em seu portfólio são comercializados hidrogéis chamados MatriXpec™ que oferecem microambientes específicos do tecido que se quer estudar. No caso da pele, o MatriXpec™ disponível é originário de matriz descelularizada de pele porcina, e contém componentes que mimetizam a MEC da pele fisiológica (TISSUELABS).

Atualmente, na área clínica e cirúrgica, já são utilizadas telas poliméricas como equivalentes dérmicos e/ou curativos para o tratamento de feridas e queimaduras de pele (SHAHROKHI; ARNO; JESCHKE, 2014; CORRÊA, 2018). Elas podem ser constituídas por materiais biológicos, como o Integra® ou Matriderm®, ou sintéticos como Dermagraft® e Transcyte®. Esses materiais são formulados para mimetizar as propriedades essenciais da MEC, sendo que seu sucesso na medicina regenerativa depende das suas características fundamentais, químicas e físicas, entre as quais se destacam: arquitetura tridimensional, forma e resistência mecânica compatível à derme, estrutura porosa que permita boa ancoragem, proliferação e migração celular, composição química que minimize a resposta inflamatória e imunológica, além da taxa de degradação controlada que permita a substituição gradual e ordenada do suporte pelo tecido biológico funcional (GOMES et al., 2013;).

De maneira geral, as matrizes são confeccionadas para terem diâmetros de poros entre 20 a 125 µm, que permitam a infiltração de fibroblastos e células endoteliais na ferida. No processo de regeneração da pele, essa matriz é, gradualmente, reabsorvida na medida em que a derme é regenerada e vascularizada (CORRÊA, 2018).

Adicionalmente, essas telas podem ser cultivadas com células como os queratinócitos e fibroblastos autólogos, alógenos ou neonatais (FERREIRA et al., 2011; VAN ZUIJLEN et al., 2015). O uso combinado dos fibroblastos e queratinócitos nesses substitutos dérmicos cria um modelo vivo de pele, na qual a presença e a produção de citocinas e fatores de crescimento por essas células (ZAULYANOV;

KIRSNER, 2007) melhoram a regeneração dérmica e epidérmica, reduzindo a contração da ferida, acelerando a cicatrização e diminuindo a fibrose no local (COULOMB; LEBRETON; DUBERTRET, 1989; LAMME et al., 2000; PHAM et al., 2007; BALLESTEROS-CILLERO et al., 2019). Porém, a obtenção de células autólogas pode ser inviável no caso de pacientes muito debilitados, enquanto células alógenas são, geralmente, rejeitadas, não sendo utilizadas em casos de substituição permanente da pele (HULTMAN et al., 1996).

Nesse sentido, o cultivo de CTM sobre as telas poliméricas tende a ser promissor devido ao seu potencial de diferenciação epidérmica similar ao processo fisiológico em humanos (SANTOS et al., 2019), além das suas características de baixa imunogenicidade, propriedades imunomodulatórias e proliferativas. Assim, considera-se que o uso dessas células possa melhorar a regeneração da pele, diminuindo a resposta inflamatória e a possibilidade de rejeição no caso de transplantes.

Embora os estudos realizados contribuam para perspectivas do uso das CTM na medicina regenerativa na área dermatológica (HENG et al., 2005; KAMOLZ et al., 2006; TOAI ET AL., 2011), os mecanismos moleculares e as vias de sinalização que regulam a diferenciação das CTM em queratinócitos *in vivo* ainda não estão esclarecidos. Além disso, o comportamento das CTM em modelos de pele 3D *in vitro* ainda é um campo com literatura escassa, apesar de sua importância na engenharia tecidual.

Assim, de modo geral, este projeto é dividido em três vertentes: a primeira aborda a utilização das CTM como equivalente epidérmico sobre suportes dérmicos já estabelecidos e/ou comercializados na pesquisa; a segunda trata-se de investigar os genes que são modulados no processo cicatricial quando essas células são utilizadas como equivalentes epidérmicos ou como tratamento direto e indireto (meio condicionado) em cultura organotípicas de peles feridas; e a última, avalia a confecção e viabilidade de utilização de *scaffold* polimérico obtido pelo processo de eletrofiação (**Figura 3**).

Figura 3 - Organograma geral das vertentes investigadas nesse projeto.

1) CTM como equivalente epidérmico, utilizando os seguintes suportes dérmicos:

- Colágeno com fibroblastos;
- Matriz Descelularizada MatriXpec®;
- Scaffold CellFate®;
- Tela absorvível comercial Integra®;

2) CTM no processo cicatricial:

- Investigação dos genes cicatriciais modulados quando as CTM são utilizadas como equivalente epidérmico, seja em peles com ou feridas;

3) Produção de *scaffold* polimérico que futuramente possa ser utilizado com CTM na medicina regenerativa

- *Scaffold* de policaprolactona e gelatina de peixe confeccionados pela técnica de eletrofiação;

Fonte: do próprio autor.

Além da terapia clínica, o desenvolvimento de modelos *in vitro* eficientes para diferenciação de células-tronco em queratinócitos, utilizando tanto suportes dérmicos já estabelecidos na pesquisa (colágeno com fibroblastos e matriz descelularizada) como modelos promissores na engenharia tecidual (*scaffolds* e telas absorvíveis) poderá fornecer ferramentas úteis tanto para o estudo da biologia da pele, teste de drogas e cosméticos, como resultar em estratégias terapêuticas, fundamentadas na engenharia de tecidos, para pacientes com queimaduras (ARNO et al., 2011; JEREMIAS et al., 2014; MOHD HILMI; HALIM, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento de CTM em modelos 3D de pele *in vitro*, utilizando diferentes equivalentes dérmicos, com perspectivas de uso na engenharia tecidual.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a transdiferenciação epidérmica de CTM usando colágeno com fibroblastos, matriz descelularizada de pele suína e *scaffolds* de nanocelulose como equivalentes dérmicos;
- b) Analisar a morfologia das células, sua disposição tridimensional e estratificação epidérmica, quando cultivadas sobre esses suportes;
- c) Estudar a expressão de marcadores epidérmicos (como CQ10, CQ14, involucrina e filagrina) durante a transdiferenciação das CTM em queratinócitos;
- d) Verificar e quantificar a presença da atividade enzimática das KLK5, 6 e 7 nos modelos propostos, em diferentes períodos de diferenciação epidérmica;
- e) Analisar a modulação na expressão de genes relacionados ao processo de cicatrização, em ensaio de fechamento de ferida, usando as CTM como equivalente epidérmico;
- f) Confeccionar e caracterizar *scaffolds* que possam ser utilizados como suporte dérmico na engenharia tecidual.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção da cultura celular

As CTM provenientes do cordão umbilical, armazenadas no Banco de Células do Laboratório de Fisiologia da Pele e Bioengenharia, foram utilizadas conforme regulamentação do Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (número 4.351.554). Após descongelamento, essas células foram distribuídas em frascos de 75 cm² na densidade de 5×10^5 células/ml e incubadas em atmosfera úmida, CO₂ 5%, a 37 °C em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – do inglês, Dulbecco modified Eagle Medium) com soro fetal bovino (SFB) 10%.

Fibroblastos dérmicos primários e queratinócitos basais primários foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Citopatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, coordenado pela Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler. Eles foram obtidos de amostras de pele provenientes de cirurgia de postectomia e doadas com o consentimento do paciente ou responsável legal.

Os fibroblastos foram cultivados nas mesmas condições que as CTM, em meio DL10. Já os queratinócitos foram mantidos em meio de crescimento de queratinócitos KGM (do inglês, Keratinocyte Growth Medium) com seu respectivo suplemento (KBM™ Gold™ Basal Medium e KGM™ Gold™ SingleQuots™ supplements, Lonza®) sob atmosfera úmida, com 5% de CO₂ a 37°C.

3.2 Caracterização das células isoladas do cordão umbilical

3.2.1 Imunofenotipagem

As células aderentes, com morfologia de CTM (fibroblastoide), foram submetidas à imunofenotipagem, por citometria de fluxo, para identificação de marcadores de superfície específicos. As células foram removidas da placa de cultura com solução de tripsina 0,25% e centrifugadas a 400 x g por 5 min. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, as mesmas foram ressuspensas e incubadas com 300 µl de

PBS contendo SFB 2% (tampão de bloqueio – TB) por 15 min à temperatura ambiente (TA) protegidas da luz.

Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 400 x g por 5 min, ressuspensas em 100 µl de TB e incubadas com um dos seguintes anticorpos: anti-CD44 (conjugado com FITC), anti-CD29 (conjugado com PE), anti-CD90 (conjugado com PE), anti-CD105 (conjugado com PE), anti-CD73 (conjugado com PE), que reconhecem marcadores presentes nessas células, além do anti-CD34 (conjugado com PerCP) e anti-CD31 (conjugado com PE), que não são expressos em CTM, por 1 h no escuro, à TA. Após a incubação, foi adicionado 1 ml de TB às amostras, sendo as mesmas centrifugadas por 5 min a 400 x g e ressuspensas em 300 µl de TB para análise. As características desses antígenos estão listadas na **Tabela 1** abaixo:

Tabela 1 – Características dos marcadores de superfície utilizados para imunofenotipagem das CTM por citometria de fluxo.

Marcador	Descrição	Referência
CD 105	Glicoproteína de membrana do tipo I, receptor acessório para ligantes da família TGF-β	Lin et al., 2013
CD 73	Ecto-5'-nucleotidase conversora de monofosfato de adenosina intracelular em adenosina	Lin et al., 2013
CD 44	Receptor de hialuronidase, importante molécula de adesão celular	Moraes, 2018
CD 29	Integrina VLA-β, receptor de superfície envolvido na adesão celular	Wright et al., 2021
CD 90	Proteína ligada a glicosilfosfatidilinositol envolvida em interações célula-célula e célula-matriz	Lin et al., 2013
CD 34	Glicoproteína transmembrana marcadora de células-tronco hematopoiéticas	Lin et al., 2013
CD 31	PECAM-1, molécula de adesão plaquetária, marcador de célula endotelial	Santos et al., 2019

Fonte: do próprio autor.

Foram avaliadas dez mil células por amostra no citômetro de fluxo Guava (Merck Millipore), equipado com laser de argônio para análises com os filtros FL1 ($\lambda = 530$ nm), FL2 ($\lambda = 570$ nm) e FL3 ($\lambda = 650$ nm), utilizando-se o software InCyte™ (Merck Millipore). Os resultados foram expressos em histogramas representativos das células marcadas em relação ao total de eventos.

3.2.2 Diferenciação em tecidos de origem mesenquimal

As células isoladas do cordão umbilical foram plaqueadas na concentração 5×10^4 /ml em placas de seis cavidades (35 mm de diâmetro) e submetidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, separadamente, conforme Santos et al. (2019).

Após a cultura atingir confluência de cerca de 80%, o meio de proliferação foi substituído pelo de diferenciação correspondente, sendo o mesmo trocado a cada 72 h. No 21º dia de cultivo, as placas foram lavadas com TB e fixadas com *p*-formaldeído (PFA) 4,0%, pH 7,4 por 30 min. Após fixação, as mesmas foram lavadas, novamente, com TB e submetidas à análise citoquímica, relacionada à diferenciação correspondente. Esses experimentos foram realizados em triplicatas e as imagens obtidas por microscopia óptica.

3.2.2.1 *Diferenciação adipogênica*

O meio de cultura foi substituído por DL10 suplementado com dexametasona 1,0 μ M, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 500 μ M, indometacina 60 mM e insulina 5,0 μ g/ml. Após 21 dias, as células foram fixadas e coradas com solução de Oil Red 0,5% preparada em etanol: clorofórmio (1:1) para a identificação do acúmulo intracelular de vacúolos ricos em lipídios, confirmando a diferenciação adipogênica.

3.2.2.2 *Diferenciação osteogênica*

Para diferenciação osteogênica foi utilizado o meio DL10 suplementado com ácido ascórbico 50 μ M, β -glicerofosfato 10 Mm e dexametasona 0,1 μ M e SFB 10%. Após três semanas, as células fixadas foram coradas com nitrato de prata 5,0%, por uma hora, sob luz amarela de 100 W (coloração de Von Kossa). Esse corante foi utilizado para identificação do acúmulo de fosfato de cálcio na matriz extracelular. Para a coloração de contraste, foi utilizada solução de safranina 5,0% (método de Van Gieson) preparada em ácido acético 1,0%, que cora o núcleo e o citoplasma celular em vermelho.

3.2.2.3 Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica foi utilizado o meio DMEM suplementado com dexametasona 100 nM, ácido ascórbico 50 µM, piruvato de sódio 1,0 mM, ITS-Premix (suplemento para meio de cultura contendo insulina, transferrina e ácido selênico) 1,0% e SFB 10%. Após 21 dias, a diferenciação condrogênica foi avaliada pela coloração de azul de toluidina para identificação de mucopolissacarídeos da matriz extracelular, o que confirma a diferenciação condrogênica. Para isso, as células foram mantidas por 5 min em contato com azul de toluidina 1,0% e, em seguida, lavadas com água destilada para remoção do excesso do corante.

3.3 Diferenciação das CTM em queratinócitos em modelo 3D de pele humana reconstruída *in vitro* com diferentes suportes dérmicos

Com objetivo de se desenvolver uma epiderme estratificada e terminalmente diferenciada, foi utilizada a técnica de interface ar-líquido (IAL), na qual o equivalente dérmico fica em contato com o meio de cultura na parte basal e, em sua porção apical, cultiva-se o equivalente epidérmico em contato com o ar. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 h e as amostras foram obtidas e analisadas em diferentes períodos de cultivo em IAL. Três abordagens distintas foram utilizadas para mimetizar a derme, conforme descrito a seguir.

3.3.1 Colágeno e fibroblastos

Para produção do equivalente dérmico, fibroblastos dérmicos humanos ($1,5 \times 10^5$ /derme) foram ressuspensos em solução de colágeno de cauda de rato do tipo I com meio Hams-F12 10 x concentrado. Essa solução foi transferida para uma placa de 24 poços e mantida em incubadora à 37°C por 20 min. Após polimerização do colágeno, foi adicionado 1 ml de DMEM para normalização do pH 7,0. A placa foi mantida por 2 h à 37°C, em atmosfera úmida com CO₂ 5%.

Para produção dos equivalentes epidérmicos foram utilizados: 1) queratinócitos basais (controle positivo), 2) CTM cultivadas em DL10 (meio de proliferação) ou 3) CTM previamente induzidas à diferenciação em queratinócitos por 4 dias pela

incubação com meio para queratinócitos livre de soro (KSFM, do Inglês, *Keratinocyte Serum Free Medium*, ThermoScientific, EUA) com seu respectivo suplemento.

O modelo de pele 3D *in vitro* padrão, chamado de pele full *thickness*, desenvolvido no laboratório de Citopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da USP, coordenado pela professora Silvy Maria Engler, utiliza queratinócitos basais ($2,5 \times 10^5$ /epiderme). Nesse modelo, os queratinócitos ficam imersos em meio KGM/RAFT (1:1) por 24 h, e depois são expostos à interface ar-líquido por 10 dias em meio RAFT, descrito na **Tabela 2** (CATARINO et al., 2018).

As CTM foram submetidas à diferenciação epidermal a partir do cultivo com os seguintes meios no período de imersão: 1) KGM/RAFT (1:1); 2) KSFM:RAFT (1:1); 3) KSFM/KGM/RAFT (1:1:2); 4) RAFT; 5) DL10/KSFM/RAFT (1:1:2), cujas composições estão listadas na **Tabela 2**. As CTM cultivadas em DL10 foram utilizadas como controle negativo. Após período de imersão de 1 ou 10 dias, trocando-se o meio a cada 48 h, as amostras foram expostas à IAL sob atmosfera úmida com CO₂ 5%, a 37°C, durante 10 dias, conforme modelo de pele padrão (**Figura 4**).

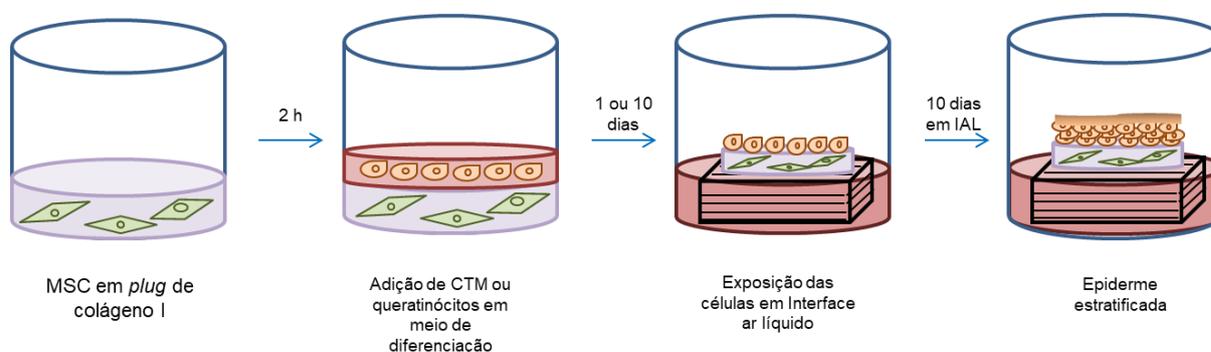
Após 10 dias de IAL, a espessura epidérmica foi medida em, pelo menos, 12 regiões aleatórias da potencial epiderme, utilizando-se o software *ImageJ*. Os dados expressos foram expressos como a média \pm EP.

Tabela 2 – Meios de cultura usados durante período de imersão das células distribuídas sobre os equivalentes dérmicos. Após confecção do equivalente dérmico (colágeno e fibroblastos), as CTM ou queratinócitos basais foram cultivados durante 1 ou 10 dias nos meios KGM/RAFT (1:1), KSFM/RAFT (1:1), KGM/KSFM/RAFT (1:1:2), RAFT, DMEM/KSFM (1:1). EGF: fator de crescimento epidermal; CaCl₂: cloreto de cálcio; BPE: extrato de pituitária bovina;

Meio de imersão	EGF (ng/ml)	CaCl ₂ (mM)	Insulina (µg/ml)	Toxina Colérica (nM)	Hidro-cortisona (µg/ml)	Apo-transferina (µg/ml)	BPE (ml/ml)	Epinefrina (µg/ml)
KGM	0,13	0,06	5,00	-	0,33	10,0	0,01	0,39
KSFM	5,00	1,80	IGF?	-	-	-	-	-
RAFT	0,50	1,30	5,00	0,10	0,40	5,00	-	-

Fonte: do próprio autor.

Figura 4 – Modelo experimental para estabelecimento de epiderme estratificada utilizando colágeno I e fibroblastos como suporte dérmico. Após gelatinização do *plug* de colágeno, as CTM ou queratinócitos foram cultivados durante 1 ou 10 dias em diferentes meios. Após esse período, as células foram expostas à IAL por diferentes períodos.



Fonte: do próprio autor.

3.3.2 Matriz descelularizada MatriXpec™

Fibroblastos dérmicos ($1,5 \times 10^5$ /derme) foram ressuspensos em 1 ml da matriz descelularizada MatriXpec™ - pele (**Figura 6**), comercialmente desenvolvida pela empresa TissueLabs™, e incubados a 37°C em atmosfera úmida com CO₂ 5%.

Após polimerização da matriz, as CTM ($2,5 \times 10^5$ /epiderme) foram distribuídas sobre os plugs de MatriXpec™, tanto em DL10, ou meio de diferenciação KGM:RAFT (1:1) durante 24 h, conforme modelo de pele 3D descrito acima no item 3.3.1. Após esse período, as amostras foram expostas à IAL por 10 dias, em DL10 ou meio RAFT, para as amostras controle ou induzidas à diferenciação, respectivamente. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h, e as amostras foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com CO₂ 5%.

3.3.3 Scaffold CellFate®

Essa etapa do trabalho foi desenvolvida durante o doutorado sanduíche empresarial financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sendo a única bolsa do país aprovada nessa modalidade em 2021.

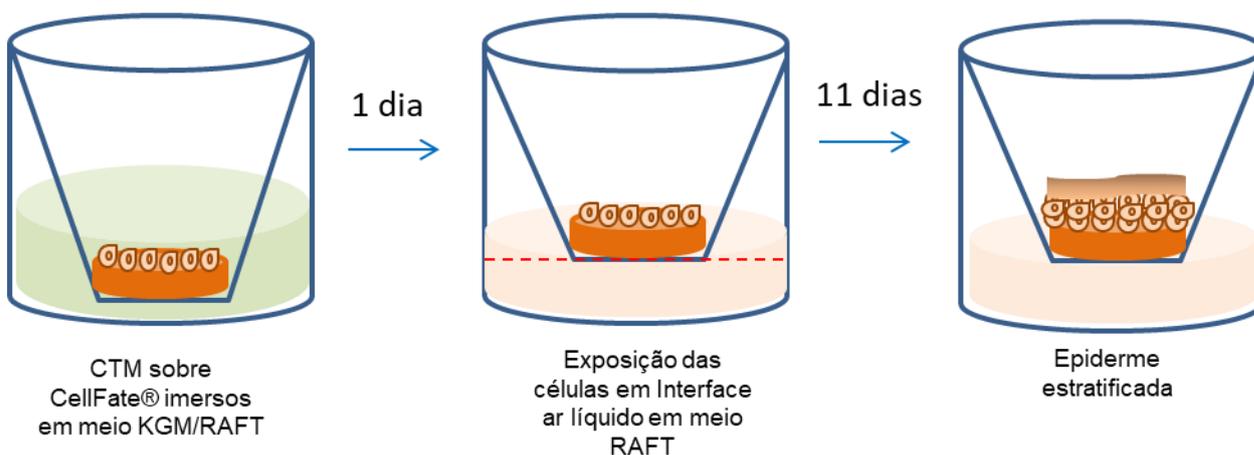
Para desenvolvimento da epiderme a partir de CTM sobre o suporte polimérico CellFate®, confeccionados pela empresa Biocelltis Biotecnologia S/A, não foi utilizada

a co-cultura de CTM com fibroblastos, mas sim, o meio condicionado dessas células, conforme protocolo de epiderme humana reconstruída (RHE, do inglês *reconstructed human epidermis*) desenvolvido na USP no laboratório de Citopatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Após preparo das placas de cultura com o CellFate® conforme as recomendações do fabricante, $2,5 \times 10^5$ CTM foram plaqueadas sobre esse suporte, e induzidos ou não a diferenciação epidérmica, conforme modelo de pele descrito acima (**Figura 5**). Na composição do meio RAFT, foram acrescentados meio condicionado de fibroblastos 5% e TGF- α 2 ng/ml (CATARINO et al., 2018). Após 24 h de imersão, as amostras foram expostas à IAL por 11 dias, sendo diminuída a umidade da incubadora para 50% nos 3 últimos dias de cultura. Como controle do CellFate®, foram utilizadas membranas de politereftalato de etila (PET) do tipo *transwell* com porosidade de 0,4 μ m.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h, e as amostras foram incubadas a 37°C, sob atmosfera úmida com CO₂ 5%.

Figura 5 – Modelo experimental para estabelecimento de epiderme estratificada utilizando CellFate® como suporte dérmico



Fonte: do próprio autor.

3.3.4 Tela absorvível Integra®

A tela absorvível Integra® (LifeSciences Corp., Plainsboro, NJ, EUA), composta por colágeno bovino e condroitin-6-sulfato, foi também usada como suporte para a diferenciação de CTM em queratinócitos.

As CTM foram cultivadas sobre essa tela, em DL10 ou KSFM com seu respectivo suplemento (conforme **Tabela 1**) por 10 dias. Após esse período, as culturas foram mantidas por 1, 7 e 11 dias em IAL em DL10 ou RAFT, para células não induzidas à diferenciação (controle) e diferenciadas, respectivamente.

3.4 Análises histológicas por microscopia ótica

3.4.1 Colágeno e fibroblastos, matriz descelularizada MatriXpec™ e scaffold CellFate®

As CTM cultivadas tridimensionalmente sob os diferentes suportes dérmicos foram analisadas histologicamente. Após período de exposição à IAL, as amostras foram fixadas em formalina 10% tamponada em PBS a 4°C por 4 h, desidratadas com álcoois em concentrações crescentes e embebidas em parafina. Os blocos foram, então, cortados em micrótomo automático Leica RM2165 (Leica, Wetzear, Alemanha) produzindo-se cortes transversais de, aproximadamente, 5 µm.

Os cortes obtidos foram dispostos em lâminas histológicas e secos em estufa a 60°C durante 2 h, para remoção do excesso de parafina. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em 2 banhos de xilol 100% por 10 min cada, hidratadas em graduação alcoólica crescente (2 banhos em etanol 100%, 1 banho em etanol 95%, 1 banho em etanol 85%, 1 banho em etanol 70%, e 2 banhos em água destilada por 5 min cada), coradas com hematoxilina-eosina (HE), e montadas com Permount® (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA). As imagens microscópicas foram obtidas em microscópio Olympus BX 60 com uma câmera digital acoplada (Axio CAM HRc – Zeiss®).

3.4.2 Tela absorvível Integra®

As CTM induzidas à diferenciação sobre a tela absorvível Integra® foram fixadas com paraformaldeído 4,0% por 15 min, e incluídas em OCT Tissue-Tek (matriz para criocorte). Essas amostras foram mantidas a -80°C até o momento do corte em criostato. Para os experimentos, foram produzidos cortes transversais de 40 µm de espessura.

Os cortes foram colocados em placas de 24 poços e suspensos em PBS. Após 3 lavagens, foram incubados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) 500 nM por 5 min.

Os cortes foram transferidos para as lâminas, as quais foram montadas com Permount® (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) para, posteriormente, serem fotografadas em microscópio Olympus BX 60 com uma câmera digital acoplada (Axio CAM HRc – Zeiss®)

3.5 Imunofluorescência

Após desparafinização e hidratação, as lâminas foram lavadas com PBS, permeabilizadas com PBS contendo Triton X-100 0,1% por 20 min e, novamente, lavadas com PBS. Foi realizada a recuperação antigênica com a incubação das lâminas em tampão citrato 0,01M pH 6,0 por 30 min a 95°C.

Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, as amostras foram incubadas com PBS contendo SFB 10% por 20 min. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário anti-CQ10, anti-CQ5 e anti-involucrina, nas concentrações descritas na **Tabela 3**, por 12 h a 4°C protegidas na luz. Para visualização das células marcadas positivamente, foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG conjugados com FITC. As células foram lavadas e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha). Em todos os experimentos foram usados, como controles, queratinócitos basais (controle positivo) e CTM não induzidas à diferenciação (controle negativo). As imagens são representativas de análise feita em teste cego, com $n \geq 3$ em, pelo menos, 10 campos aleatórios analisados sob à mesma exposição.

Tabela 3 – Anticorpos usados na imunofluorescência (IF) com suas respectivas especificações e diluições.

Anticorpo Primário	Fonte	Clone	Diluição	Fabricante
Anti-CQ10	Anticorpo monoclonal de coelho IgG	KRT10/1990R	1:100 (IF)	GeneTex, EUA
Anti-CQ5	Anticorpo monoclonal de coelho IgG ₁	D4U8Q	1:100 (IF)	Cell Signaling, EUA
Anti- involucrina	Anticorpo policlonal de coelho IgG	N1N2	1:100 (IF)	Santa Cruz, EUA

Fonte: do próprio autor

3.6 Verificação da atividade de enzimas envolvidas na diferenciação

Para avaliação da atividade enzimática das KLK, os substitutos dérmicos, constituídos de colágeno e fibroblastos ou matriz descelularizada, foram, inicialmente, dissociados das epidermes por separação mecânica, e as amostras lisadas com 200 μ l do tampão HEPES 25 mM, pH 7,5, Triton X- 100 0,5% (tampão de lise), para obtenção das proteínas. A epiderme formada por queratinócitos basais foi analisada após 4, 7 e 10 dias de IAL. Já a epiderme potencialmente formada pelas CTM foi analisada somente após 10 dias de IAL.

Já em relação às potenciais epidermes formadas sobre substituto dérmico mimetizado pelo Integra®, as amostras foram lisadas com 200 μ l do mesmo tampão de lise, e analisadas após 1, 7 e 11 dias de IAL.

A atividade de KLK5, KLK6 e KLK7 foi verificada na capacidade das proteínas presentes nos extratos hidrolisarem substratos fluorogênicos (FRET) (ANGELO et al., 2006; LOURA; PIETRO, 2011) específicos para tais enzimas. Foram utilizados 40 μ l de amostra com 50 μ l do tampão de reação enzimática 2 x concentrado (Tris 100 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM e Tween 20 0,01%) e 10 μ l de substrato (100 μ M), totalizando 100 μ l de volume final.

A caracterização da atividade das KLK foi realizada com o uso dos inibidores específicos: Inibidor de tripsina de soja (SBTI) 100 e 500 μ M e aprotinina 5 μ M para KLK5; tosil-fenilalanil-clorometil cetona (TPCK) 100 e 500 μ M para KLK7. A hidrólise dos substratos (10 μ M) foi acompanhada pelo aumento da fluorescência em $\lambda_{ex}=320$ nm e $\lambda_{em}=420$ nm na leitora de placas Dynegy HT (Biotek, Winooski, VT, EUA) conforme Santos et al. (2019).

Os resultados de velocidade média para cada reação foram obtidos utilizando-se o software Gen5™ (BioTek, Winooski, VT, EUA). A atividade enzimática foi medida em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) por min e expressa em termos da velocidade média da reação por 1 μ g de proteína presente nos extratos. A **Tabela 4** apresenta o tipo de KLK e os substratos com seus sítios de clivagem.

Tabela 4 – Calicreínas teciduais epidérmicas (KLK) e seus respectivos substratos FRET

Calicreína	Tipo de atividade	Substrato (10 µM)	Local de clivagem
KLK5	Tripsina	Abz-KLRSSKQ-EDDnp	KLR↓SSKQ
KLK6	Tripsina	Abz-AFRFSQ-EDDnp	AFR↓FSQ
KLK7	Quimotripsina	Abz-KLYSSKQ-EDDnp	KL↓YSSKQ

Fonte: Santos et al. (2019); ↓: sítio de clivagem.

3.7 Análise da expressão de proteínas

3.7.1 Extração do RNA e produção da fita de DNA complementar

Após 4, 7 e 10 dias de IAL, as peles foram coletadas e lavadas em PBS. Para extração do RNA utilizou-se o Mini Kit Rneasy (Qiagen, Frederick, MD, EUA), conforme instruções do fabricante. De maneira geral, as peles foram colocadas na coluna que contém uma membrana de sílica, lisadas em tampão RLT e homogeneizadas. O etanol foi, então, adicionado ao lisado, criando as condições que promovem a ligação seletiva do RNA à membrana. Os contaminantes foram lavados em tampão RW1, e tampão RPE e, então, o RNA foi eluído em água Ultra pura.

Após quantificação, 2 ng de RNA tiveram a fita complementar de DNA (cDNA) sintetizada a partir do kit RT² First Strand (Qiagen, Frederick, MD, EUA) em duas etapas: a primeira consistiu na eliminação do DNA genômico usando-se 8 µl de RNA (2 µg) e 2 µl do tampão GE 5x concentrado, sendo a mistura incubada por 5 min a 42°C; a segunda etapa refere-se a transcrição reversa, na qual foram usados 10 µl do produto da primeira etapa, 4 µl de tampão de reação 5 x concentrado (BC3), 1 µl de controle P2 (oligo dT), e dNTPs 10 mM, totalizando 20 µl. Essa solução foi incubada por 15 min a 42°C e, em seguida, por 5 min a 95°C em termociclador, conforme as recomendações do fabricante.

3.7.2 PCR quantitativo em tempo real

Para quantificar a expressão das proteínas CQ14, CQ10, involucrina e filagrina foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real, usando-se o SYBR® green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientifics, Massachusetts, EUA). A temperatura

utilizada para a primeira etapa de desnaturação do DNA foi de 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, por fim, a etapa final foi realizada a 72°C por 10 min, de acordo com instruções do fabricante. Com relação aos controles internos, a expressão dos genes de interesse foi normalizada pela expressão do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Fibroblastos dérmicos, CTM e queratinócitos cultivados bidimensionalmente, além da pele controle formada por queratinócitos estratificados, foram também analisados quanto a expressão dessas proteínas. A expressão foi analisada em relação à epiderme formada com CTM cultivadas em DL10 (meio de proliferação), usada como controle negativo.

Os oligonucleotídeos foram desenhados, conforme **Tabela 5**, de modo a se evitar anelamentos inespecíficos e respeitando-se as recomendações para o uso em PCR quantitativo. As reações foram desenvolvidas no aparelho Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, EUA).

Tabela 5 – Sequência dos oligonucleotídeos para CQ10, CQ14, involucrina, filagrina e GAPDH

Primer	Sequência	Referência
CQ10	Forward: CAACCTAACAACTGATAATGCC	Santos et al. (2019)
	Reverse: GTCTTTCATTTCTCCTCGT	
CQ14	Forward: GGAACAAGATTCTCACAGCC	Santos et al. (2019)
	Reverse: TCCATCTCCACATTGACATCTC	
Involucrina	Forward: AATGAAACAGCCAACTCCACTGCC	Fernandes et al., (2022)
	Reverse: TCTTGCTTTGATGGGACCTCCACT	
Filagrina	Forward: TGAAGCCTATGACACCACTGA	Wang et al. (2017)
	Reverse: TCCCCTACGCTTTCTTGTCCT	
GAPDH	Forward: CATTTCCTGGTATGACAACGA	Santos et al. (2019)
	Reverse: GCACAGGGTACTTTATTGATGG	

Fonte: do próprio autor.

3.8 Ensaio de cicatrização

Esse ensaio foi dividido em duas etapas: a primeira buscou investigar quais genes envolvidos com o processo cicatricial são modulados quando as CTM são

utilizadas como equivalente epidérmico. Na segunda, foi avaliada a modulação dos genes relacionados à cicatrização quando as peles, compostas por CTM ou queratinócitos (controle) receberam um estímulo (ferida) para que esse evento ocorra.

3.8.1 Estabelecimento de modelo 3D simplificado de ferida

As peles com CTM ou queratinócitos foram confeccionadas conforme descrito no **item 3.3.1** usando-se 1 dia de imersão. Os três grupos experimentais foram: i) CTM cultivadas em DL10, ii) CTM cultivadas em RAFT e iii) queratinócitos cultivados em RAFT (controle positivo) como equivalentes epidérmicos.

Após 10 dias de exposição à IAL, foi realizada uma ferida incisional por pele, com 4 mm de diâmetro, utilizando-se um instrumento para punção (*punch*) de biópsias (adaptado de Egles; Garlick; Shamis; 2010). O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e as amostras foram incubadas a 37°C, sob atmosfera úmida com CO₂ 5% (**Figura 9**).

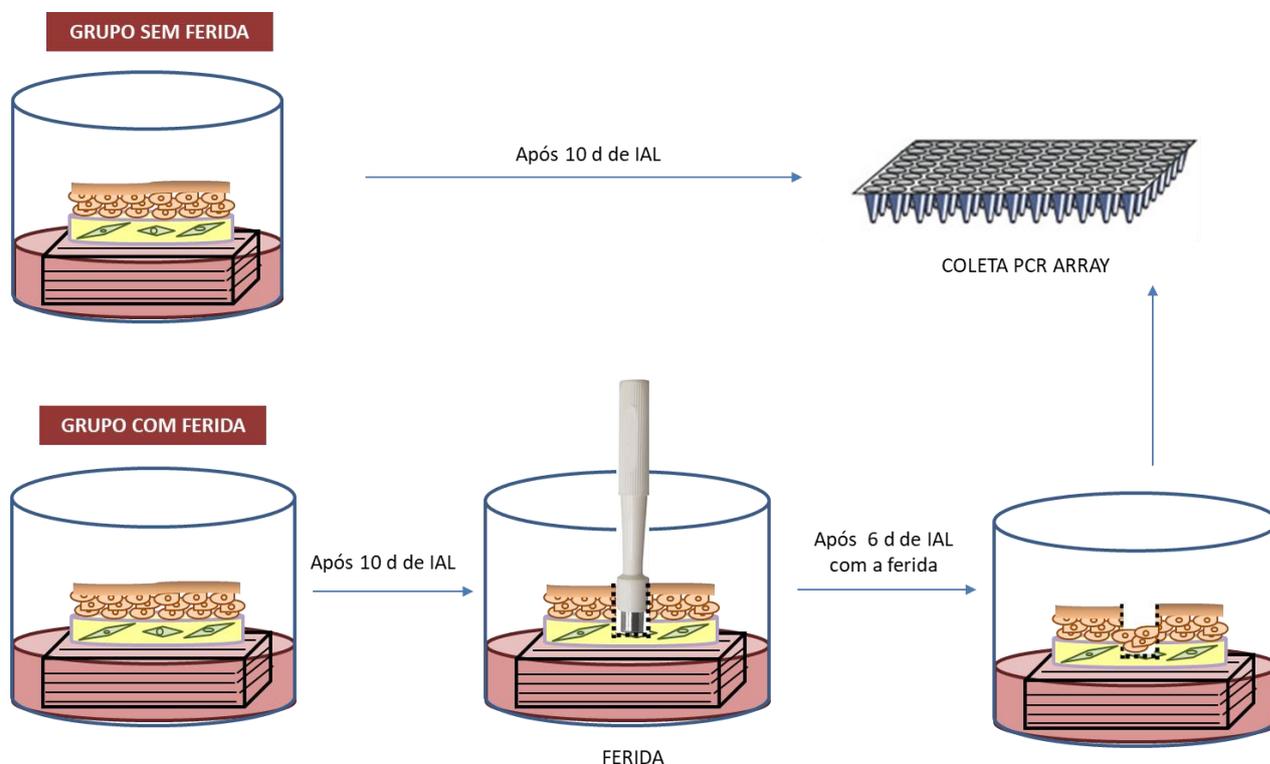
Após 6 dias da realização da ferida, as amostras foram coletadas para análise, totalizando um período de 16 dias em IAL.

3.8.2 Investigação dos genes envolvidos no processo cicatricial

Para investigação dos genes envolvidos na cicatrização foi utilizado o RT² Profiler PCR Array – *Wound Healing* (Qiagen, Frederick, MD, EUA), usando-se a técnica de PCR quantitativo. O ciclo em que a reação cruzou o limiar de detecção (Ct – do inglês, cycle threshold) do gene de interesse foi correlacionado com a quantidade de RNAm alvo. Para a normalização da quantidade de genes constitutivos, foram usados a média dos Ct dos genes controles fornecidos no kit (β -actina, β -2 microglobulina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, hipoxantina fosforibosiltransferase 1, proteína ribossomal P0).

Os grupos analisados foram as amostras sem ferida após 10 dias de exposição à IAL, e as amostras com 6 dias de exposição à IAL após a ferida, conforme mostrado na **Figura 6**.

Figura 6 – Esquema de montagem das peles nos grupos “sem ferida” e “com ferida” para análise de expressão gênica por PCR Array – Wound healing.



Fonte: do próprio autor.

3.9 Confeção e caracterização de *scaffold* polimérico para engenharia tecidual

Além da diferenciação das CTM em células epiteliais sobre equivalentes dérmicos já utilizados na pesquisa e indústria, durante o doutorado sanduíche realizado na Universidade Nova de Lisboa, Portugal, foram confeccionados *scaffolds* poliméricos eletrofiados passíveis de utilização na engenharia tecidual e medicina regenerativa, ou até mesmo como suporte dérmico na produção de equivalentes 3D de pele na pesquisa.

Esse doutorado foi realizado sob supervisão da Profa. Dra. Maria de Fátima Raposo, no Laboratório de Engenharia de Tecidos da Faculdade de Ciência e Tecnologia (Caparica, Portugal). Os dados obtidos durante esse doutorado foram publicados na revista ACS Applied Biomaterials, onde a autora dessa tese compartilha a primeira autoria no artigo, conforme **APÊNDICE B**.

3.9.1 Eletrofiação

Para a produção dos *scaffolds* poliméricos, foram utilizados o polímero sintético policaprolactona (PCL) e o natural proveniente de gelatina de peixe de água fria. Os *scaffolds* foram obtidos pelo processo de eletrofiação horizontal (também conhecido como *electrospinning*), capaz de originar fibras que se assemelham arquitetonicamente à matriz extracelular. Nesse processo, a solução polimérica é ejetada, através de um capilar, por uma bomba infusora, em um espaço onde existe um campo elétrico intenso. A ponta da agulha é polarizada de forma que a gota da solução polimérica carrega a carga da tensão aplicada. Para além do efeito da repulsão entre as cargas a sua superfície, a gota sente o efeito da força exercida pelo campo elétrico que se estabelece entre a agulha e o coletor e adquire uma forma cônica, denominada cone de Taylor. A repulsão eletrostática entre as cargas que transporta é responsável pelo seu estiramento. À medida que o solvente evapora, o polímero carregado eletricamente executa movimento oscilatório caótico até a sua deposição no coletor (GOMES, 2013).

Foi utilizado um sistema de co-deposição com potencial fixo de 10,0 kV e 12,5 kV, para soluções de PCL 20%, diluída em ácido acético 95%, e gelatina 40%, diluída em água destilada, respectivamente, aplicados a uma distância de 15 cm entre a ponta da agulha e o coletor, durante 6 h (**Figura 7**). As soluções foram depositadas em lamínulas de vidro de 22 mm² de diâmetro fixadas ao coletor, à temperatura ambiente e umidade de $23 \pm 3^\circ\text{C}$ e de $40 \pm 5\%$, respectivamente.

Após a deposição, os *scaffolds* foram reticulados por 5 h em vapor de glutaraldeído (GTA) 5%, em sistema fechado a 40°C . Depois foram introduzidos em um dessecador durante 24 h para remoção de qualquer resíduo de GTA.

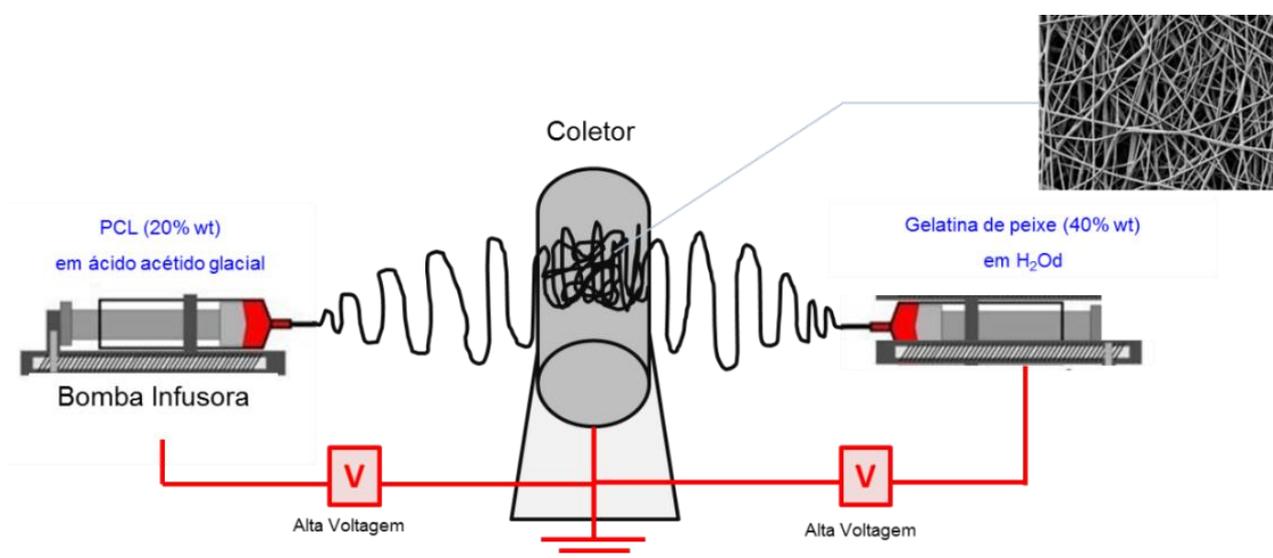
3.9.2 Análise da Citotoxicidade

Os meios condicionados (MC) dos materiais foram preparados incubando-se DMEM, sem vermelho de fenol, com os *scaffolds* durante 24 h, conforme regulamentado pela norma da Organização Internacional para Padronização (do inglês, International Organization for Standardization – ISO) 10993-5. A relação entre o volume de meio e a massa do *scaffold* foi de 800 μl /10 mg.

Fibroblastos dérmicos da linhagem finita HFFF2 foram distribuídos na concentração de $2,0 \times 10^4$ células/cm² em placas de 24 poços e tratadas com os extratos dos biomateriais, em diferentes concentrações (1:1, 1:2, 1:4 diluídos em DMEM), além de SFB 10%, durante 24 ou 72 h a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada usando-se o corante resazurina 0,02 mg/ml. Esse corante azulado, com absorvância em 570 nm virtualmente nula, ao ser adicionado à cultura celular, é reduzido à resorufina (600 nm) pelo ambiente redutor mantido pelas células viáveis em seu citosol. A conversão da resazurina em resorufina é proporcional ao número de células e função da sua viabilidade.

Para realização dessa técnica, foram adicionados 45% dos MC dos *scaffolds*, SFB 5%, e 50% de uma solução de resazurina 0,04 mg/ml em PBS. Após 2 h de incubação, o MC foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância medida no leitor de placas Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, EUA), utilizando-se o software Gen5™ (BioTek, Winooski, VT, EUA).

Figura 7 - Esquema do processo de electrospinning para confecção dos *scaffolds*. Deposição dupla dos polímeros sintético (PCL) e natural (gelatina de peixe) pelo processo de eletrofiação horizontal.



Fonte: do próprio autor.

Os graus de citotoxicidade do MC foram caracterizados segundo a **Tabela 6** (GOMES et al., 2013).

Tabela 6 - Caracterização da citotoxicidade dos *scaffolds* em função da viabilidade celular relativa

Citotoxicidade	Viabilidade celular relativa (%)
Não citotóxico	≥ 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

Fonte: Gomes et al. (2013)

3.9.3 Análises por Microscopia de Varredura nos Scaffolds

Para avaliar a estrutura dos *scaffolds* produzidos e a interação das células com esses materiais, foram realizadas análises por microscopia de varredura (MEV). Para tanto, após cultivo das células HFFF2 sobre os equivalentes dérmicos por 3 e 7 dias, os mesmos foram lavados com PBS e fixados com glutaraldeído 3%. Após 2 h, o fixador foi retirado e as placas contendo as amostras foram lavadas com água destilada e fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 1 h, seguida de lavagens com água destilada e álcoois em concentrações crescentes (50 a 100%). As placas foram secas em estufa 37°C. Na sequência, foram submetidas a um revestimento metálico com ouro no aparelho metalizador EMITECH K550, sendo analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435–P - Zeiss, Alemanha). Os diâmetros das fibras foram medidos a partir das imagens de MEV com o programa de análise de imagem *ImageJ* (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012)

3.10 Análise dos resultados

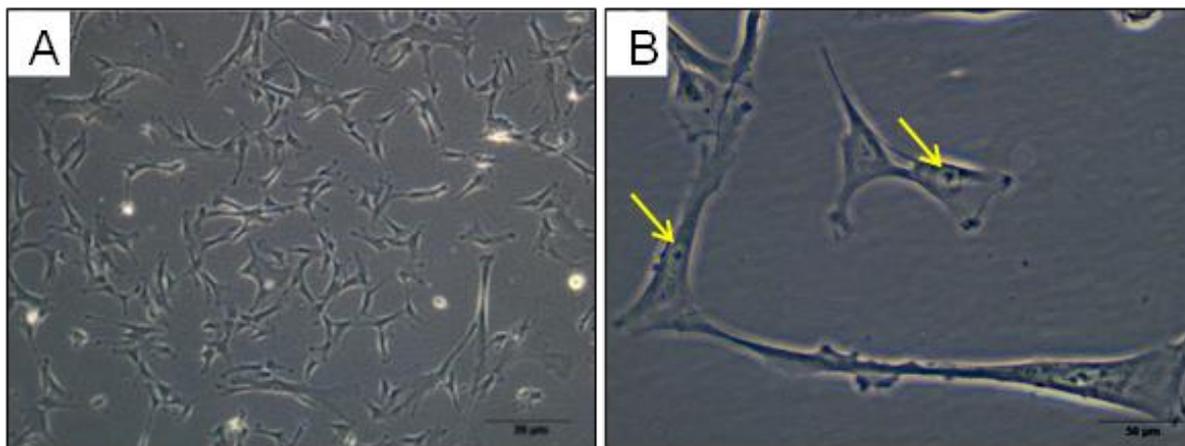
Os dados quantitativos foram expressos como valores médios com \pm erro padrão (EP) com $n \geq 3$. Para comparação estatística, os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism 5, usando o teste two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, com significância variando entre $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), estatisticamente diferente em relação ao controle. Na microscopia, foi avaliada a morfologia das células, sua disposição tridimensional e possível estratificação epidérmica com auxílio do software *ImageJ* (SCHNEIDER, RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo das CTM

As células descongeladas e cultivadas em DL10 aderiram ao plástico e apresentaram formato fibroblastoide com núcleo e nucléolos evidentes (**Figura 8**), características de CTM.

Figura 8 - Morfologia das CTM do cordão umbilical após 7 dias de descongelamento. (A) As células apresentaram-se como uma população com forma fibroblastoide, (B) com núcleo e nucléolos evidentes (setas amarelas). Aumento de 50 x em (A) e 400 x em (B).



Fonte: do próprio autor.

4.2 Caracterização das CTM por imunofenotipagem

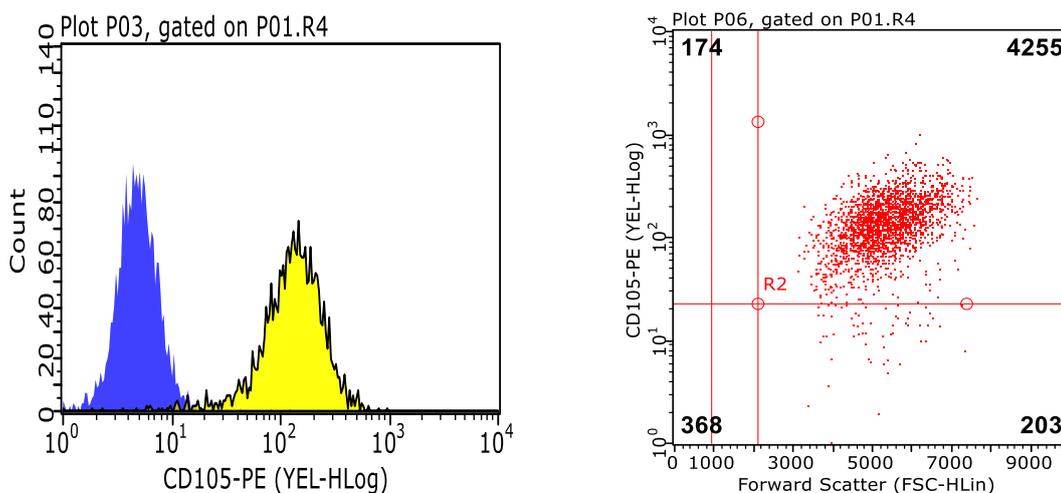
Antígenos caracterizados como positivos para CTM, como CD105 (**Figura 9A**), CD73 (**Figura 9B**), CD44 (**Figura 9C**), CD29 (**Figura 9D**), e CD90 (**Figura 9E**) apresentaram marcação positiva para as células analisada, e os antígenos presentes em células hematopoiéticas e endoteliais, CD34 e CD31, respectivamente, não foram detectados por citometria, conforme mostrado nas **Figuras 9F e 9G**.

Essa figura é composta por histogramas, que mostram o número de eventos em função da fluorescência, e diagramas de densidade (*density plots*), que mostram a dispersão frontal ou FSC (do Inglês, de *Forward Scatter*), parâmetro que se relaciona ao tamanho das células, em função da intensidade da fluorescência das mesmas. Os quadros são representativos dos resultados obtidos em três experimentos individuais.

Figura 9 - Imunofenotipagem das CTM por citometria de fluxo. Histogramas e *Density Plots* mostram as células marcadas positivamente para (A) anti-CD105-PE, (B) anti-CD73-PE, (C) anti-CD44-FITC, (D) anti-CD29-PE e (E) anti-CD90-PE, que são antígenos de superfície expressos em CTM; e negativamente para (F) anti-CD34-PerCP e (G) anti-CD31-PE, antígenos de superfície presentes em células-tronco hematopoiéticas e endoteliais, respectivamente, não expressos em CTM. O pico em azul refere-se às células não marcadas (controle) incubadas somente com o anticorpo secundário conjugado com o mesmo fluoróforo do anticorpo específico.

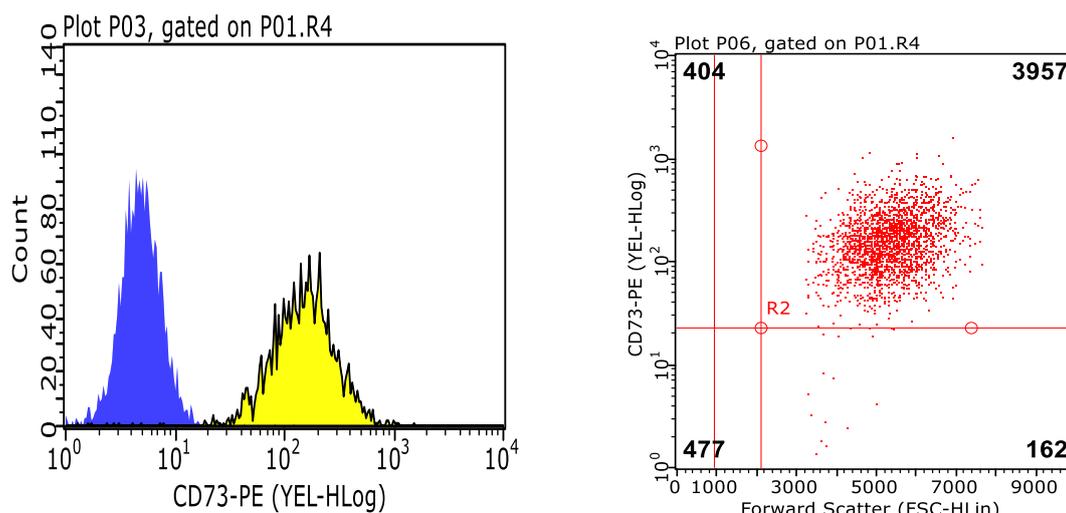
(A)

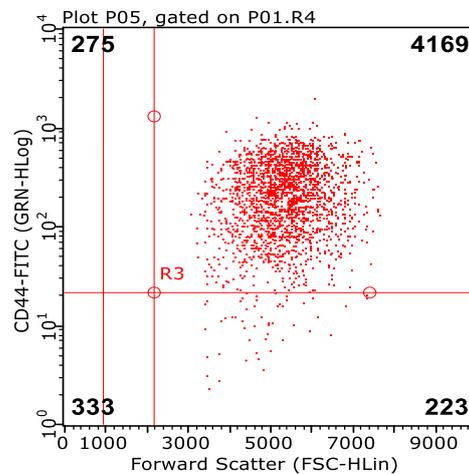
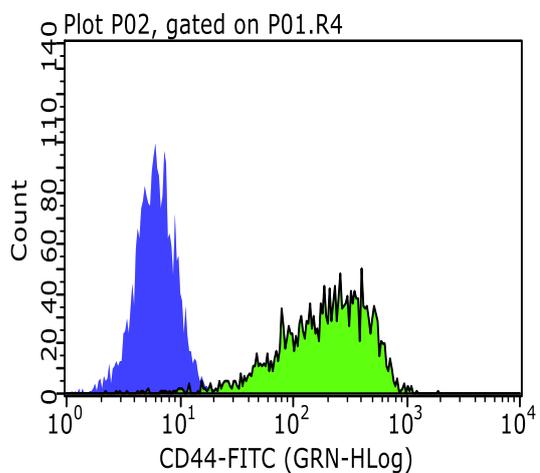
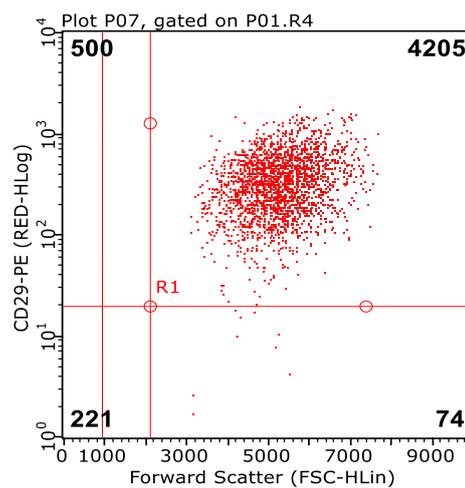
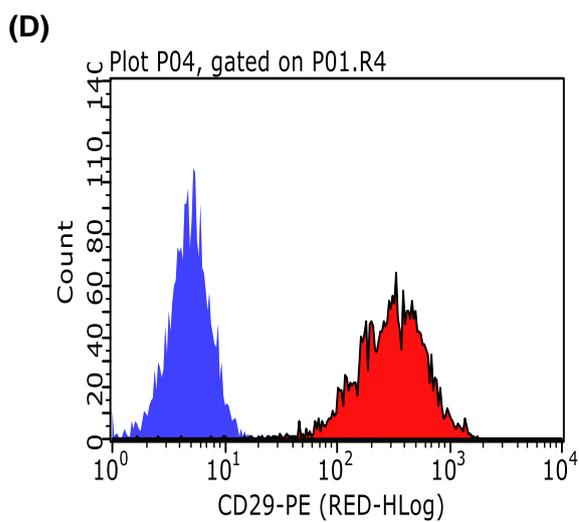
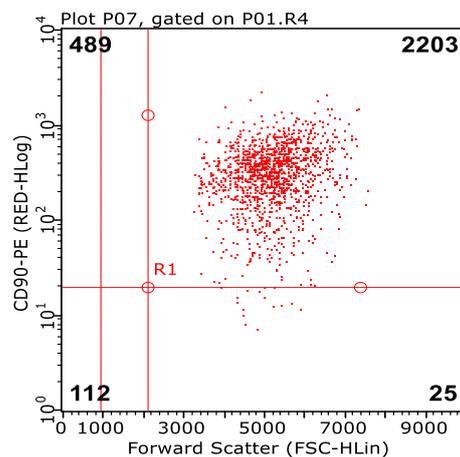
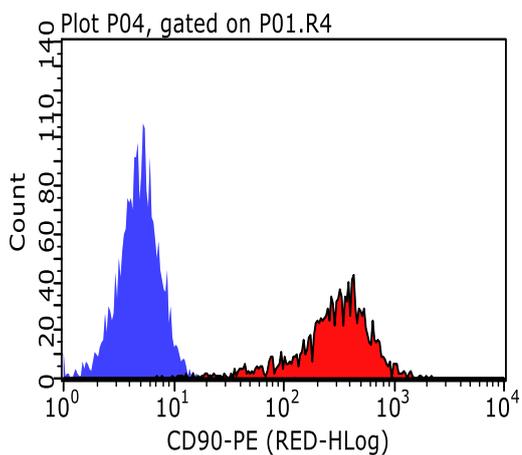
CD105

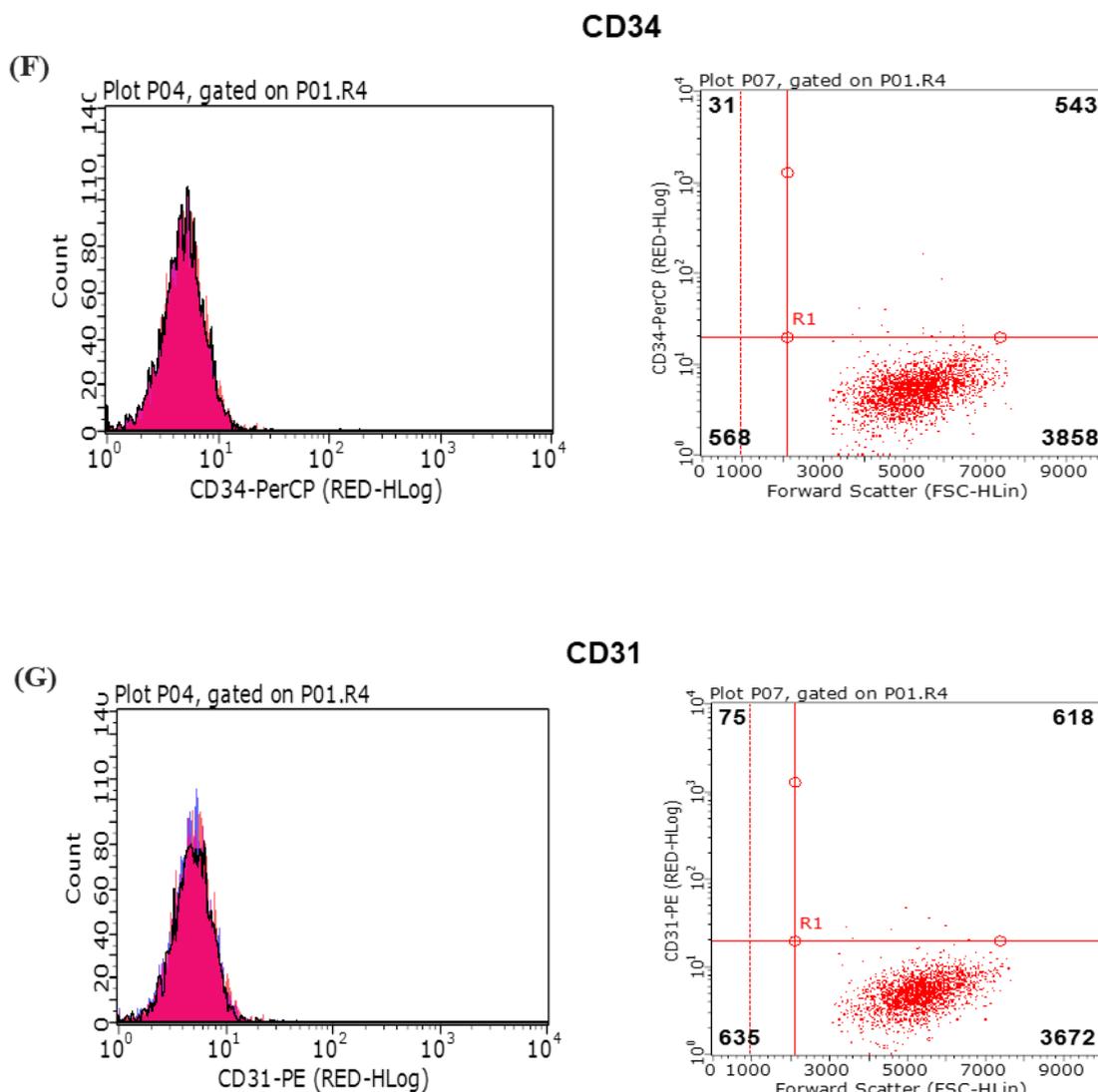


(B)

CD73



(C) CD44**CD29****(E) CD90**



Fonte: do próprio autor (Santos et al., 2019)

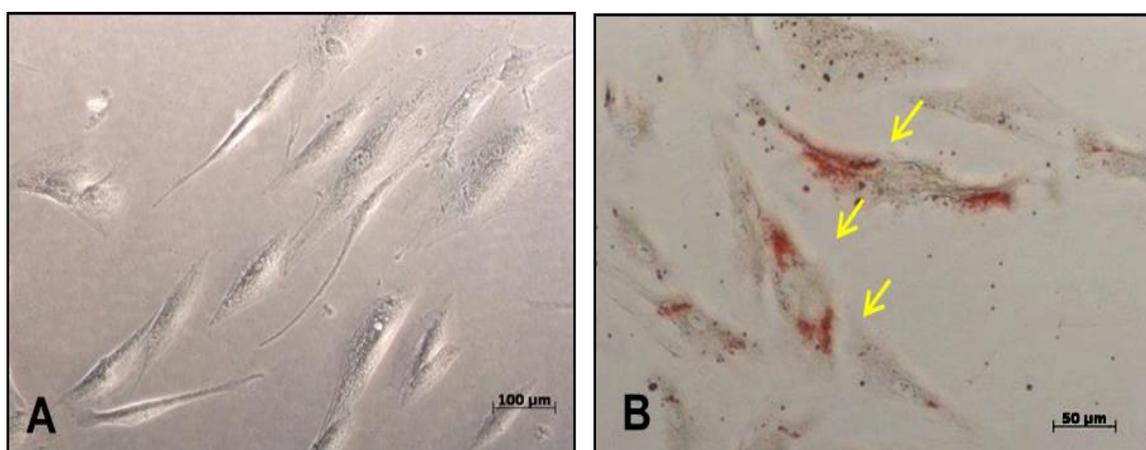
4.3 Indução da diferenciação das CTM em distintos tipos celulares

Para avaliar o potencial de diferenciação das CTM em tecidos de origem mesodérmica, modificações estruturais específicas foram observadas quando essas células foram submetidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, separadamente.

4.3.1 Diferenciação adipogênica

Após três semanas de cultivo, a diferenciação adipogênica foi verificada por meio do acúmulo de lipídios no interior de vacúolos celulares identificados pela marcação com o corante Oil Red, um corante que se dissolve em lípidos neutros corando-os de vermelho (**Figura 10B**). Esses vacúolos não foram identificados no controle (**Figura 10A**).

Figura 10 - Diferenciação das CTM em adipócitos. Após 21 dias, CTM meio específico para diferenciação adipogênica foram coradas com corante Oil Red, tendo os lipídios intracelulares marcados (setas amarelas) nas células diferenciadas (B), sendo os mesmos ausentes no controle (A). Aumento de 100 x.

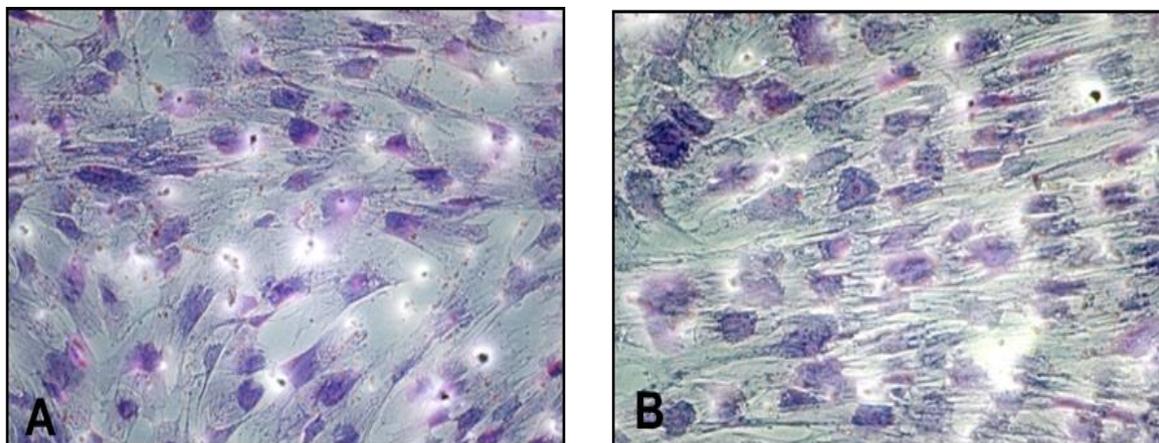


Fonte: do próprio autor (SANTOS et al., 2019)

4.3.2 Diferenciação condrogênica

O processo de condrogênese nas CTM foi observado após 21 dias de cultivo com o meio específico. O método citoquímico que emprega o azul de toluidina demonstrou que as células induzidas a essa diferenciação mudaram sua morfologia de fibroblastoide para arredondada, além do aumento do conteúdo nuclear em relação ao citoplasma, sendo esse fortemente basófilo, sugerindo a presença de moléculas componentes da matriz cartilaginosa no citoplasma. Além disso, essas células apresentaram mudanças na disposição espacial, rearranjando-se em fileiras (**Figura 11B**). Essas mudanças não foram observadas no controle (**Figura 11A**).

Figura 11 - Diferenciação das CTM em condrócitos. Em células cultivadas durante 21 dias em meio específico para diferenciação condrogênica apresentaram morfologia mais arredondada, aumento do conteúdo nuclear em relação ao citoplasma, além do enfileiramento, visualizados em fibras cartilaginosas (B). Essas mudanças não foram observadas no controle (A). Aumento de 50 x em (A) e 100 x em (B).

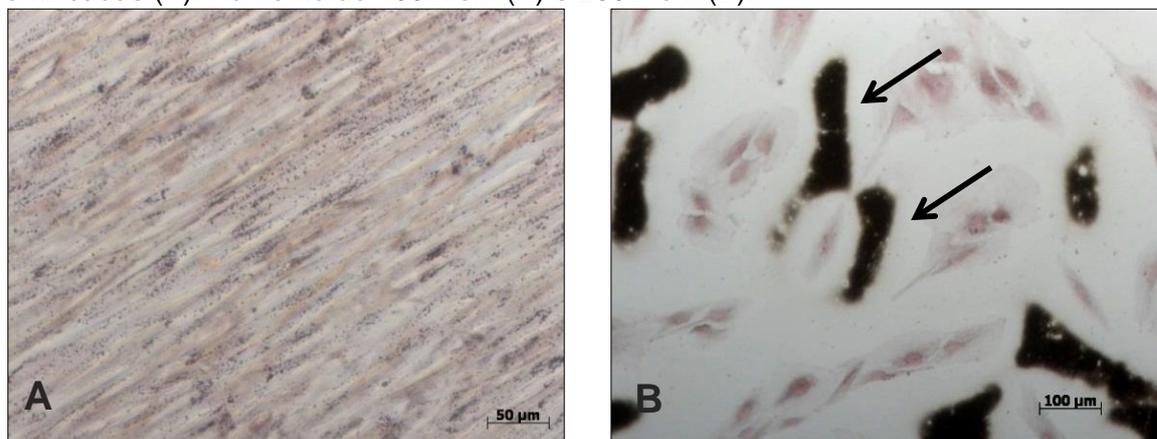


Fonte: do próprio autor (SANTOS et al., 2019)

4.3.3 Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica foi verificada pela presença de cristais de fosfato de cálcio extracelular, após 21 dias de cultivo (**Figura 12B**) em meio de diferenciação. As CTM não induzidas à diferenciação (controle) não apresentaram calcificação extra ou intracelular detectável pelo método citoquímico utilizado (**Figura 12A**).

Figura 12 - Diferenciação das CTM em osteócitos. Células cultivadas em meio específico para diferenciação osteogênica durante 21 dias, apresentaram calcificações extracelulares identificada pela presença de fosfato de cálcio na matriz extracelular (setas pretas), evidenciada pela coloração de Von Kossa (B). No controle, essas calcificações não foram identificadas (A). Aumento de 100 x em (A) e 200 x em (B).



Fonte: do próprio autor (Santos et al., 2019)

4.4 Diferenciação epidermal das CTM sobre equivalentes dérmicos

4.4.1 Colágeno e fibroblastos

4.4.1.1 *Análise Histológica*

O cultivo dos queratinócitos basais sobre a matriz de colágeno e fibroblastos que mimetiza a derme (D) resultou em uma epiderme estratificada (E) com todas as camadas: basal (CB), espinhosa (CE), granulosa (CG) e córnea (CC) (**Figura 13 A/B**), evidenciando que 10 dias de cultivo em IAL, nas condições especificadas, foram suficientes para diferenciação terminal dos queratinócitos, sendo considerada como controle positivo.

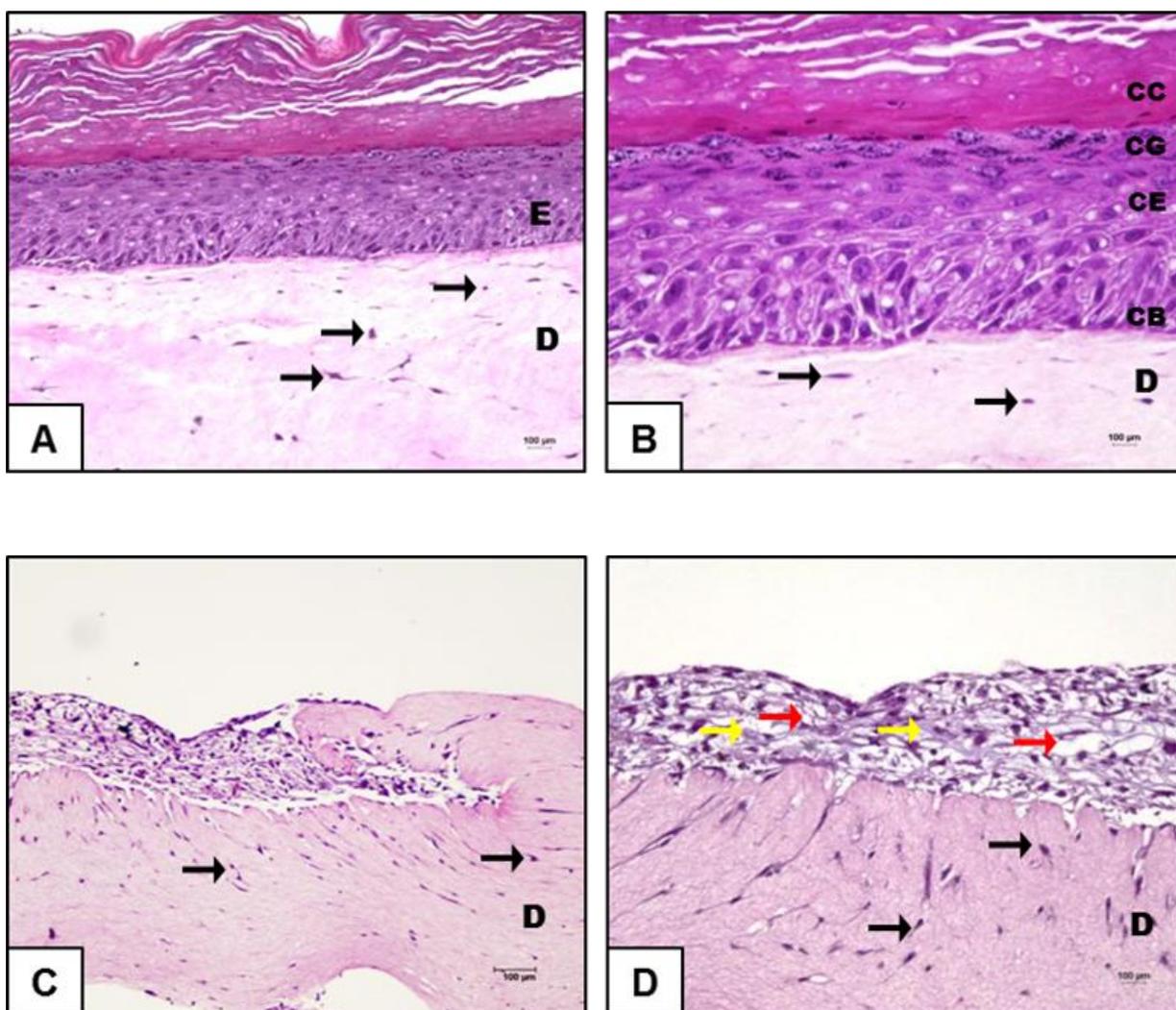
As CTM cultivadas por 1 dia nos meios de diferenciação KGM (**Figura 13 C/D**), KSFM (**Figura 13 E/F**) ou KGM/KSFM (**Figura 13 G/H**), e depois expostas à IAL por 10 dias, não resultaram em uma epiderme tipicamente estratificada, mas dispuseram-se como um tecido conjuntivo frouxo, composto por fibras frouxamente ligadas e por células dispersas e embebidas em uma substância fundamental gelatinosa, sem predominância de nenhum dos componentes. As CTM cultivadas em DL10 dispuseram-se, aproximadamente, como uma monocamada sobre o equivalente dérmico (**Figura 13 I/J**) e seu cultivo resultou na menor espessura epidérmica comparado aos outros meios utilizados, o que sugere que a proliferação celular foi menos intensa nessa condição (**Tabela 7**).

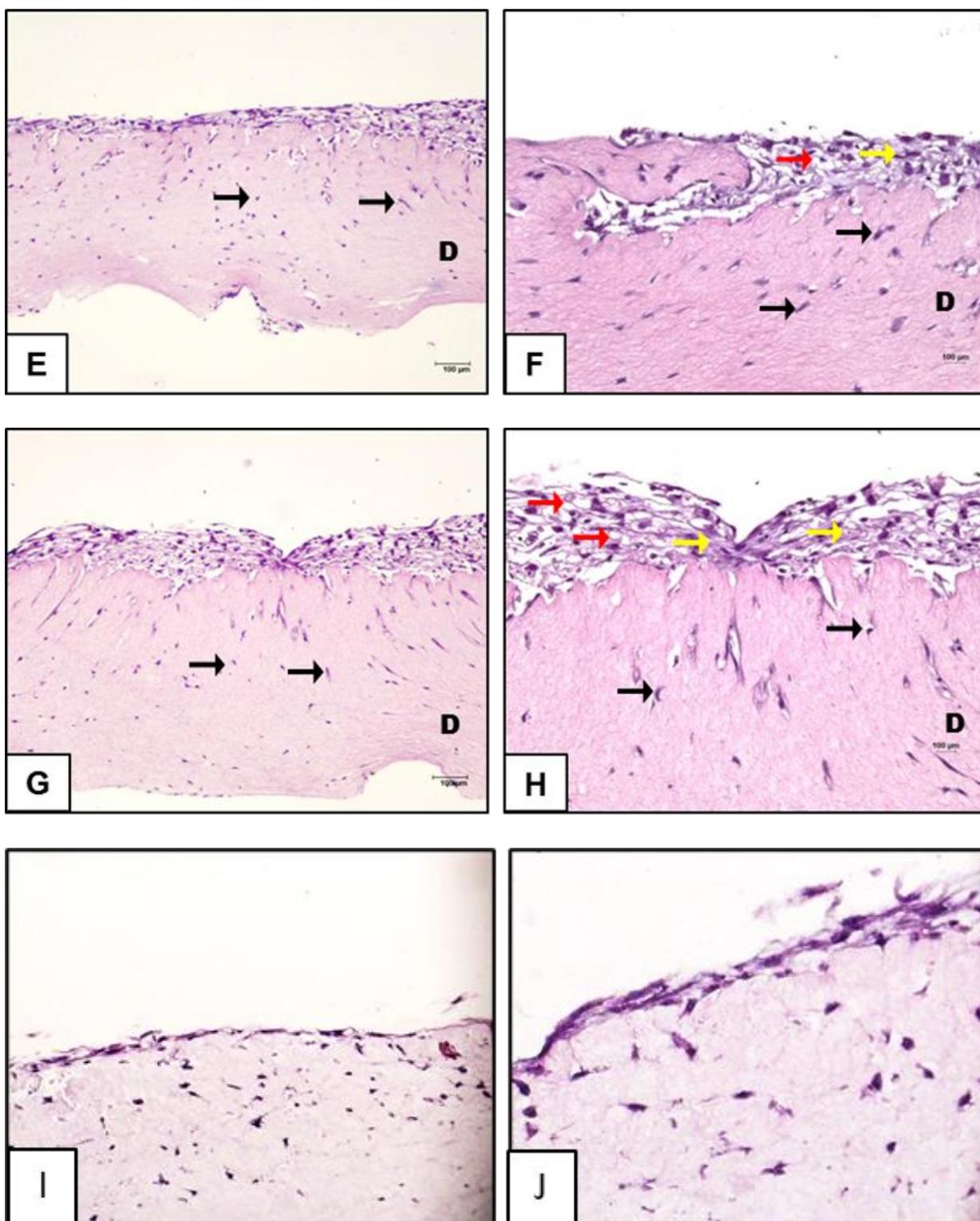
Nas **Figuras 13 e 14**, observam-se as CTM dispostas aleatoriamente sobre a derme, envolvidas por MEC (identificada por setas amarelas). A MEC presente na potencial epiderme apresentou coloração arroxeada, identificada pela hematoxilina, o que a caracteriza como basófila, possivelmente por conter muitas moléculas com grupamentos ácidos. Nessas amostras, não é nítida a separação dermoepidérmica. Ainda, em algumas figuras, nota-se a presença de vacúolos não corados (identificados por setas vermelhas), o que sugere um fenótipo esponjoso similar ao de células adiposas.

As CTM cultivadas em KGM (**Figura 14C/D**) apresentaram maior proliferação do que nos outros meios de cultivo utilizados durante o período de imersão por 1 dia,

que foi avaliada pela espessura da potencial camada epidérmica formada sobre a matriz dérmica (**Tabela 7**). Nessas culturas, também é observada a presença de vacúolos não corados (setas vermelhas), característicos de um tecido com perfil esponjoso como o adiposo.

Figura 13 - Fotomicrografia de CTM induzidas a diferenciação epidermal sobre equivalente dérmico. Queratinócitos basais cultivados por 1 dia em KGM (A e B) foram usados como controle positivo para epiderme estratificada. As CTM cultivadas, previamente, em DL10 foram cultivadas sobre equivalente dérmico composto por colágeno e fibroblastos (setas pretas) por 1 dia, em meio para cultivo de queratinócitos KGM (C e D), KSFM (E e F) ou KGM/KSFM 1:1 (G e H), ou meio de proliferação DL10 (I e J). Após 1 dia de cultivo imerso, as células foram expostas a IAL por 10 dias em meio RAFT. As CTM apresentaram fenótipo de tecido conjuntivo frouxo (setas amarelas), além da presença de vacúolos (setas vermelhas), característicos de tecido adiposo, em todas as potenciais epidermes formadas. A epiderme controle obtida a partir de queratinócitos basais apresentaram todas as camadas epidérmicas (CB, CE, CG, CC). Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A, C, E, G, I) e 200 x (B, D, F, H, J). Seta preta: fibroblastos; Seta amarela: matriz extracelular; Seta vermelha: tecido esponjoso; E: epiderme; D: derme; CB: camada basal; CE: camada espinhosa; CG: camada granulosa; CC: camada córnea.





Fonte: do próprio autor.

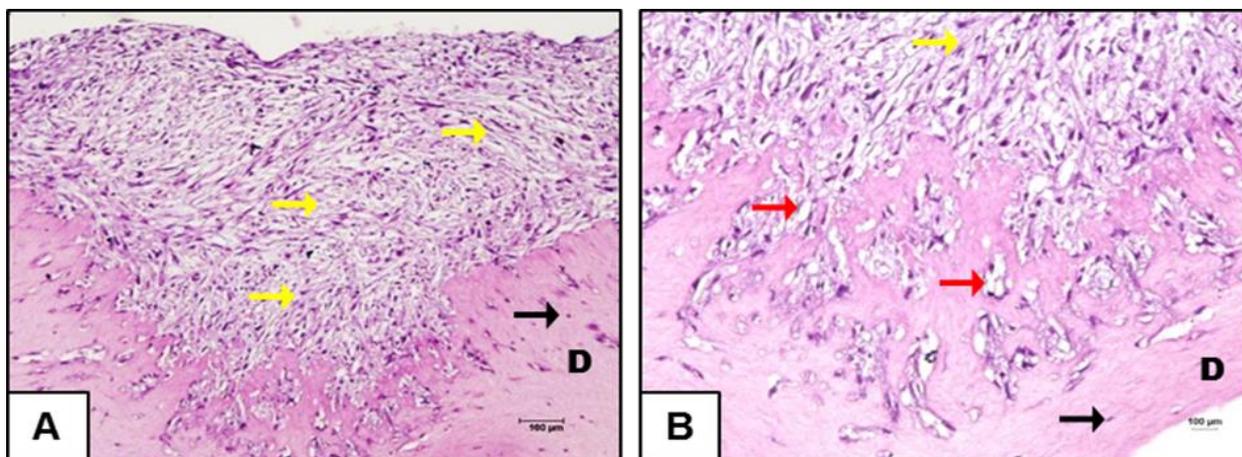
Como resultados anteriores do nosso grupo (SANTOS et al., 2019) mostraram que CTM cultivadas, bidimensionalmente, em KSFM por 4 dias passaram a expressar CQ presentes na camada basal da epiderme (CQ5 e CQ14), foram utilizadas, também, CTM previamente induzidas à diferenciação em queratinócitos por cultivo

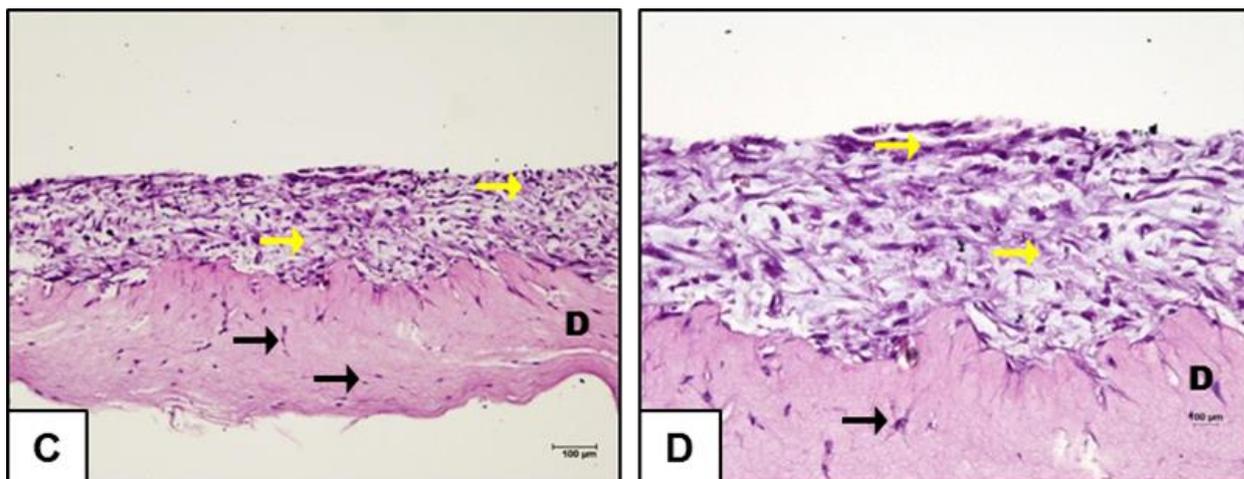
bidimensional nas mesmas condições. Após o cultivo, as células foram imersas por 1 dia em meio KGM ou KSFM sobre o equivalente dérmico, formado por colágeno e fibroblastos e, posteriormente, expostas à IAL por 10 dias em meio RAFT.

As CTM previamente diferenciadas (**Figura 14**) também não produziram uma epiderme caracteristicamente estratificada, quando cultivadas em quaisquer dos dois meios de diferenciação utilizados. As amostras cultivadas em KGM resultaram em um aglomerado celular com alta capacidade proliferativa, observada pelo aumento da espessura da camada sobre a matriz dérmica (**Tabela 7**) e da quantidade de núcleos celulares em relação ao controle positivo. As células apresentaram-se como um tecido conjuntivo frouxo, não sendo verificada estratificação ou disposição dessas células em camadas delimitadas. Ainda, as análises histológicas mostraram migração/proliferação das células em direção ao equivalente dérmico (**Figura 14A/B**), não sendo observada delimitação dermoepidérmica.

Um fenótipo de tecido conjuntivo frouxo também foi identificado nas amostras cultivadas com KSFM. Não foi verificada predominância entre MEC basófila e quantidade de células, que se dispuseram, aleatoriamente, sem organização estrutural característica (**Figura 14C/D**).

Figura 14 - Fotomicrografia das CTM pré-cultivadas em KSFM por 4 dias e induzidas à diferenciação epidermal sobre o equivalente dérmico. As CTM foram cultivadas sobre o equivalente dérmico de colágeno com fibroblastos por 1 dia, em meio KGM (A e B) ou KSFM (C e D). Após 1 dia de imersão, as células foram expostas à IAL por 10 dias. Observa-se grande quantidade de matriz extracelular (setas amarelas), principalmente nas amostras constituídas por CTM induzidas à diferenciação com meio KGM. Ainda, em algumas regiões, observa-se a presença de vacúolos não corados (setas vermelhas), que dão aspecto esponjoso ao tecido. Coloração de Hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A, C, E, G) e 200 x (B, D, F, H). D: derme.





Fonte: do próprio autor.

Tabela 7 - Espessura da epiderme potencialmente formada a partir de CTM cultivadas em IAL após 1 d de imersão

Tipo Celular	Condição prévia de cultivo	Meio de diferenciação no período de imersão (1 d)	Meio de diferenciação no período de IAL (10 d)	Espessura da camada sobre a matriz dérmica (µm)
CTM	DL10	DL10	DL10	23,52 ± 4,36 (***)
CTM	DL10	KGM/RAFT	RAFT	184,6 ± 7,71 (***)
CTM	DL10	KSFM/RAFT	RAFT	62,41 ± 10,0 (***)
CTM	DL10	KGM/KSFM/RAFT	RAFT	114,4 ± 12,1 (***)
CTM	KSFM por 4 dias	KGM/RAFT	RAFT	644,9 ± 38,3 (***)
CTM	KSFM por 4 dias	KSFM/RAFT	RAFT	245,5 ± 10,4 (***)
Queratinócitos Basais (controle)	KGM	KGM/RAFT	RAFT	451 ± 5,83

Fonte: do próprio autor.

Aparentemente, o cultivo das células por 1 dia tanto em KGM ou KSFM, antes da exposição à IAL, não foi suficiente para promover a estratificação da epiderme. Contudo, Chavez-Munoz et al. (2013) obtiveram relativo sucesso na transdiferenciação de CTM de tecido adiposo e produção de epiderme estratificada, ao cultivar as células imersas por 10 dias nos meios contendo diferentes fatores químicos, antes de expô-las à IAL, utilizando o meio de cultura DL10 e KSFM (1:1). Portanto, optamos por aumentar o período de cultivo imerso para 10 dias (**Figura 15**), e não pré-diferenciar as células com KSFM, já que, nessa condição, foi verificado

aumento de cerca de 1,5 vez na espessura da camada sobre a matriz dérmica em relação à epiderme controle, além de proliferação celular exacerbada em direção ao equivalente dérmico, sugerindo um fenótipo invasivo, comumente relacionado a fenômenos tumorais (**Figura 14B**).

As células cultivadas em KGM (**Figura 15C/D**), KSFM (**Figura E/F**), RAFT (**Figura 15G/H**), DMEM/KSFM (**Figura 15I/J**) apresentaram fenótipo típico de tecido conjuntivo frouxo, conforme descrito anteriormente para os resultados obtidos com as CTM cultivadas por 1 dias em meio diferenciação, onde foi observada a presença de fibras frouxamente ligadas e células dispersas em uma substância fundamental gelatinosa.

As células cultivadas em KGM distribuíram-se mais homoganeamente sobre o equivalente dérmico, o que se refletiu na menor dispersão média das medidas de espessura epidérmica (**Tabela 8**). A quantidade de vacúolos não corados, os quais tem sido relacionados ao fenótipo de tecido esponjoso, foi menor nessa condição (**Figura 15D**).

As células cultivadas em KSFM apresentaram perfil mais proliferativo em direção ao equivalente dérmico, de modo que a derme foi contraída até quase o fechamento da região epidérmica, não sendo possível realizar a medida da espessura da potencial epiderme no local (**Figura 15F**).

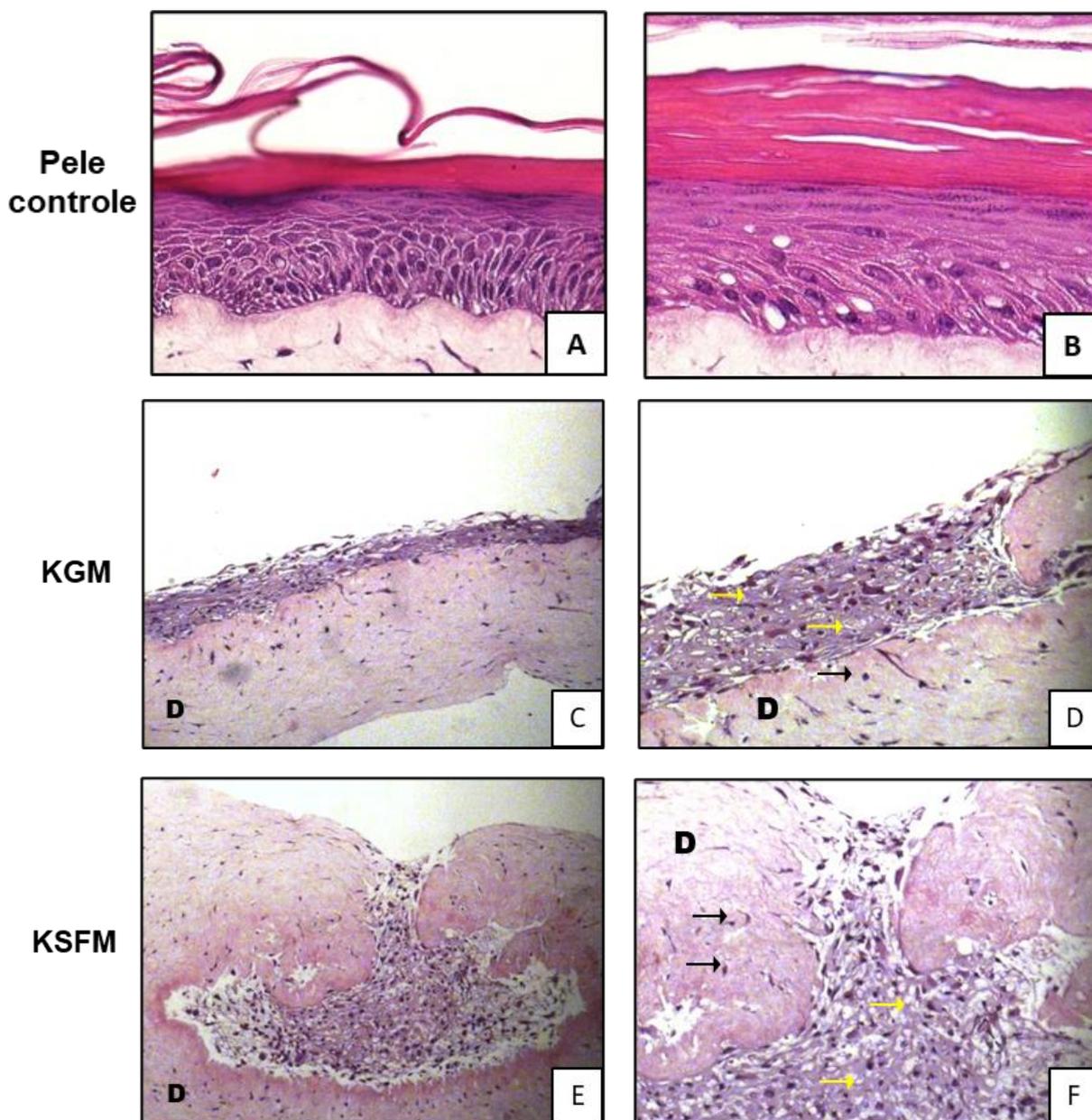
Quando cultivadas em DL10/KSFM, a potencial epiderme formada pelas CTM apresentaram mais vacúolos não corados (setas vermelhas), quando comparada às outras condições de diferenciação (**Figura 15H**).

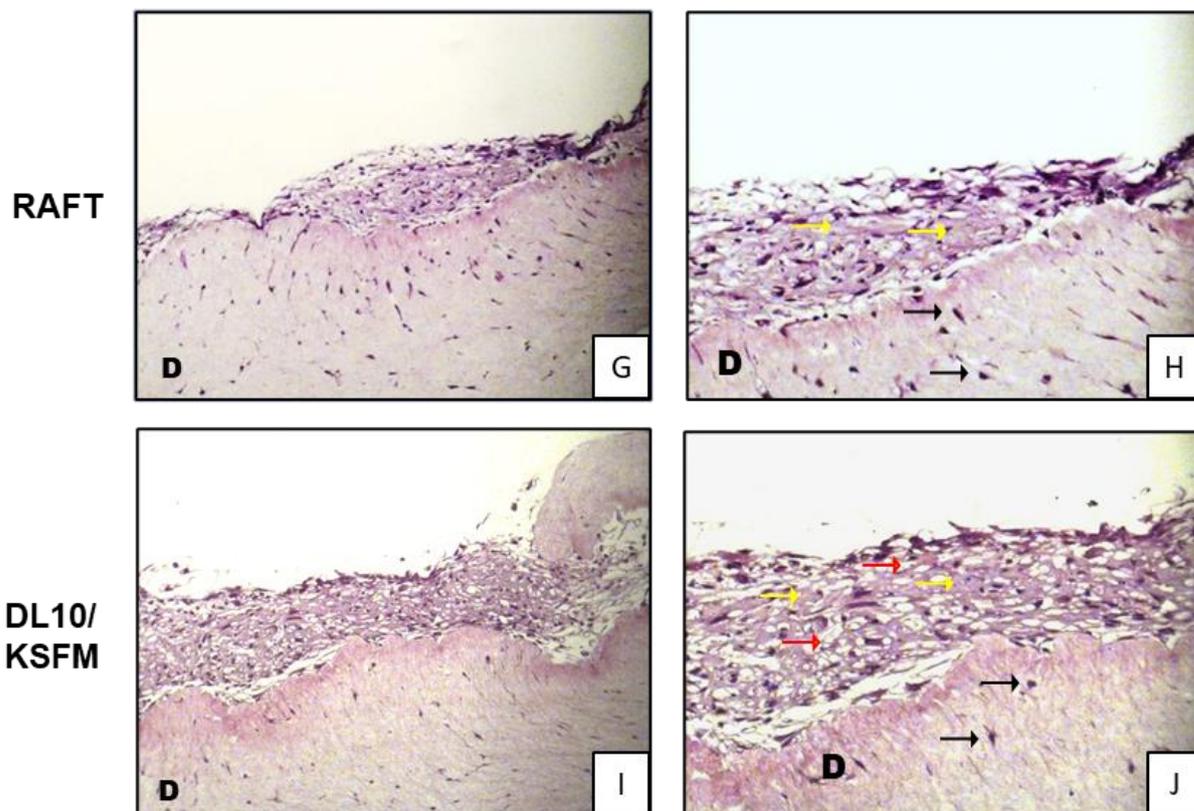
Tabela 8 - Espessura da epiderme potencialmente formada a partir de CTM cultivadas em IAL após 10 d de imersão

Tipo Celular	Meio de diferenciação no período de imersão (10d)	Meio de diferenciação no período de IAL (10d)	Espessura da epiderme (μm)
CTM	KGM/RAFT	RAFT	192,4 \pm 9,3 (***)
CTM	KSFM/RAFT	RAFT	-
CTM	RAFT	RAFT	129,8 \pm 12,6 (***)
CTM	DL10/KSFM/RAFT	RAFT	194,4 \pm 11,0 (***)
Queratinócitos Basais (controle)	KGM/RAFT por 1 d	RAFT	451,0 \pm 5,8

Fonte: do próprio autor.

Figura 15 - Fotomicrografia das CTM induzidas à diferenciação epidermal sobre equivalente dérmico com 10 dias de período de imersão. As CTM foram cultivadas sobre o equivalente dérmico de colágeno com fibroblastos durante 10 dias em meio KGM (C e D), KSFM (E e F), RAFT (G e H) ou DL10/KSFM (I e J). Queratinócitos basais cultivados imersos por 1 dia em KGM (A e B) foram usados como controle positivo. Após o período de imersão, as células foram expostas à IAL por 10 dias. As CTM induzidas à diferenciação epidérmica apresentaram fenótipo típico de tecido conjuntivo frouxo, grande produção de matriz extracelular (setas amarelas), além da presença de vacúolos não corados (setas vermelhas). Ainda, as CTM cultivadas em KSFM proliferaram em direção ao equivalente dérmico. Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 200 x (A, C, E, G, I, K) e 400 x (B, D, F, H, J, L)



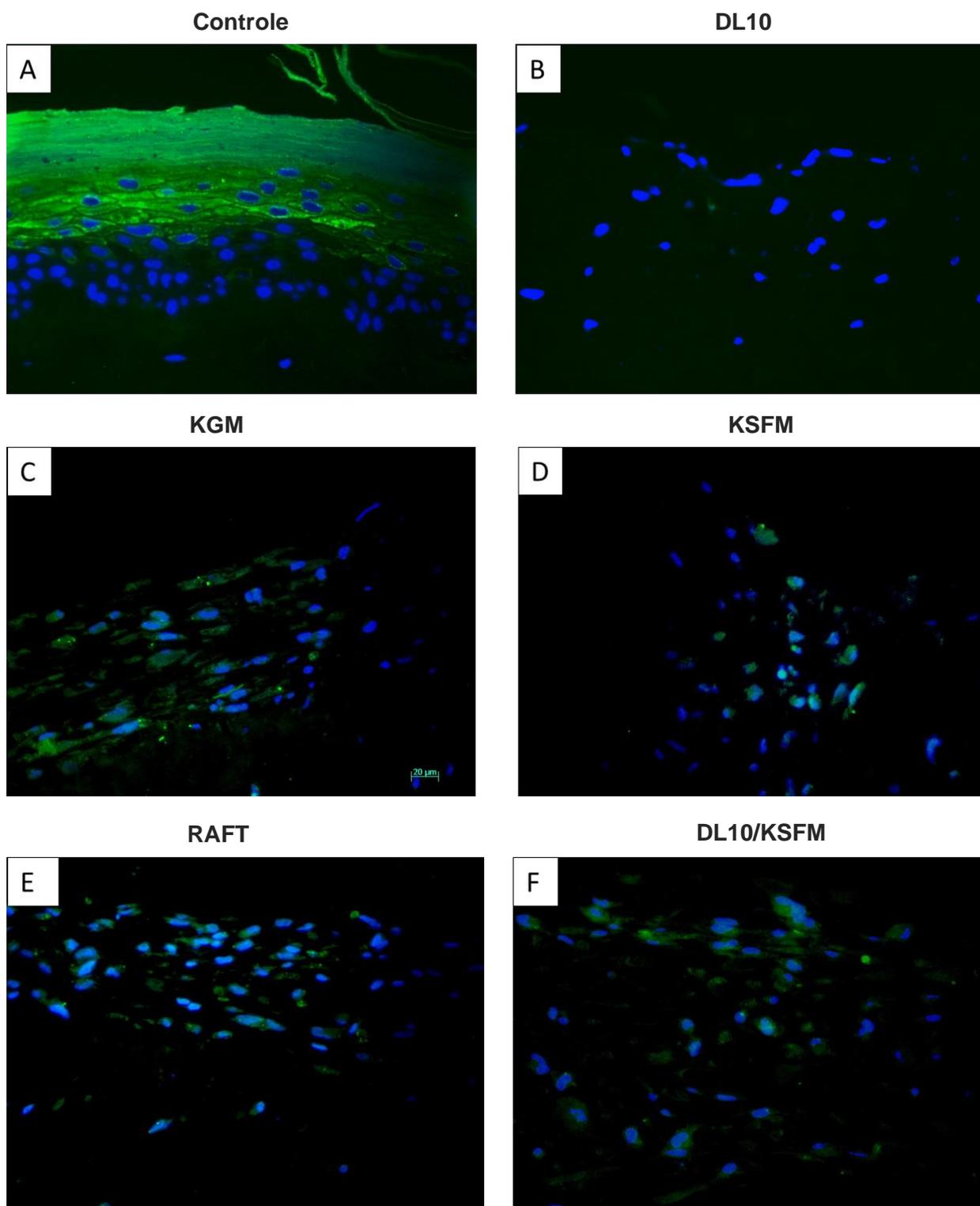


Fonte: do próprio autor.

4.4.1.2 Imunofluorescência para CQ10

Após 10 dias de exposição em IAL, foi analisada a expressão da CQ10 nas potenciais epidermes formadas sobre a matriz de colágeno e fibroblastos. Essa proteína é expressa nas camadas suprabasais da epiderme, como observado na epiderme controle (**Figura 16A**). Quando as CTM foram cultivadas em meio DL10, não foi observada a expressão dessa citoqueratina (**Figura 16B**). No entanto, ao serem cultivadas em meio de diferenciação KGM (**Figura 16C**), KSFM (**Figura 16D**), RAFT (**Figura 16E**) e DL10/KSFM (**Figura 16F**), é possível observar uma discreta expressão dessa proteína distribuída aleatoriamente no tecido, e não somente nas camadas mais superficiais, o que pode estar associado a um início de diferenciação epidermal das CTM, não observada quando usa-se meio de proliferação.

Figura 16 - Expressão de CQ10 por imunofluorescência nas epidermes formadas sobre equivalente dérmico de colágeno e fibroblastos. Após 10 dias de exposição em IAL, as CTM cultivadas no período de imersão em meio KGM (C), KSFM (D), RAFT (E) e DL10/KSFM (F) apresentaram discreta marcação para CQ10, que não é observada em CTM cultivadas em meio de proliferação DL10 (B). Essa proteína é expressa nos estratos suprabasais da epiderme formada por queratinócitos (A). Aumento de 200 x.



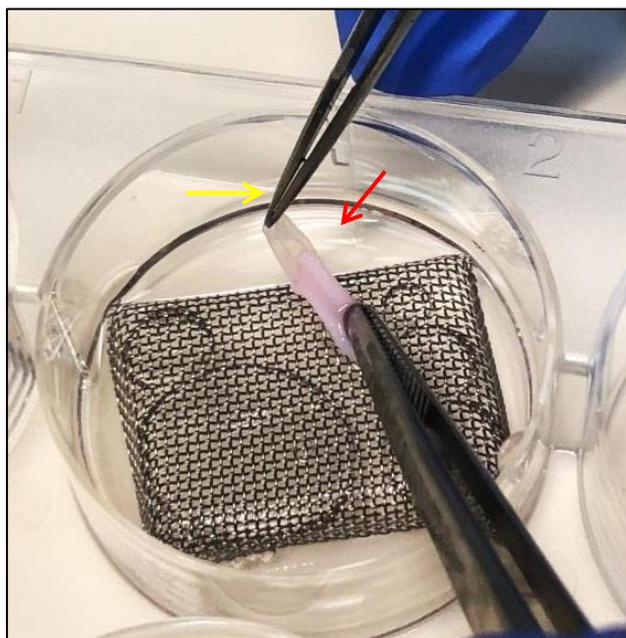
Fonte: do próprio autor.

4.4.1.3 Atividade enzimática de calicreínas teciduais

Após 4, 7 e 10 dias de exposição das culturas à IAL, a epiderme formada a partir de queratinócitos basais ou a potencial epiderme formada a partir de CTM, foi separada, manualmente, do equivalente dérmico, por tração das duas camadas em sentido opostos, conforme mostrado na **Figura 17**.

Os extratos de cada uma dessas camadas foram utilizados para quantificação da atividade enzimática de KLK5, KLK6 e KLK7, a partir da clivagem de substratos fluorogênicos específicos (FRET) específicos para essas enzimas.

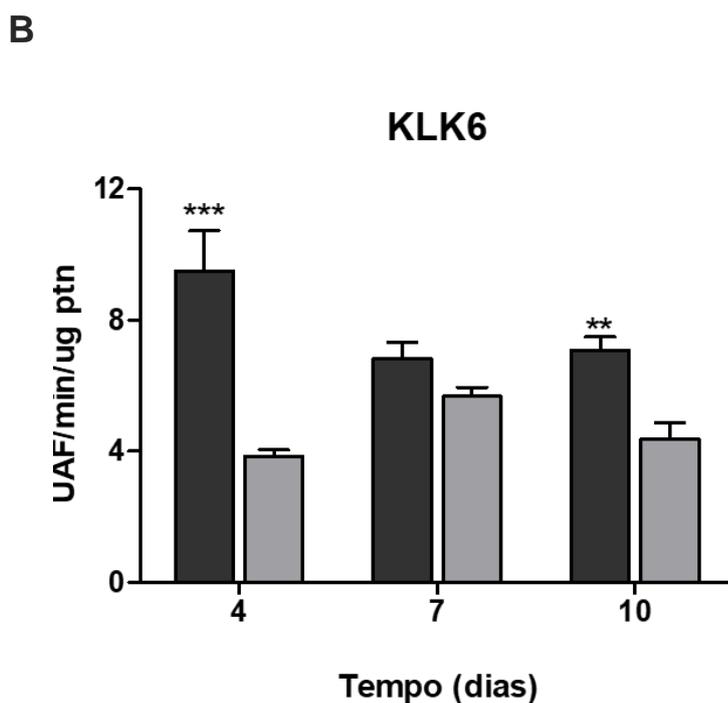
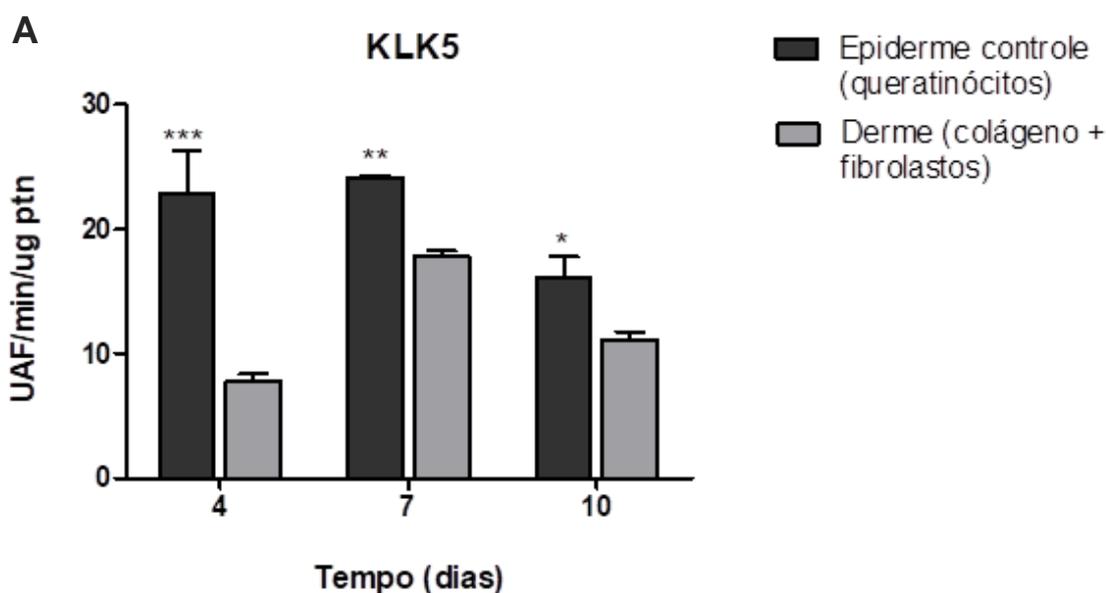
Figura 17 - Separação manual da epiderme e derme (controle positivo). Após 10 dias de exposição à IAL, a epiderme (seta amarela), caracterizada por uma película transparente, foi separada da derme (seta vermelha), manualmente, com auxílio de uma pinça, para análises posteriores.

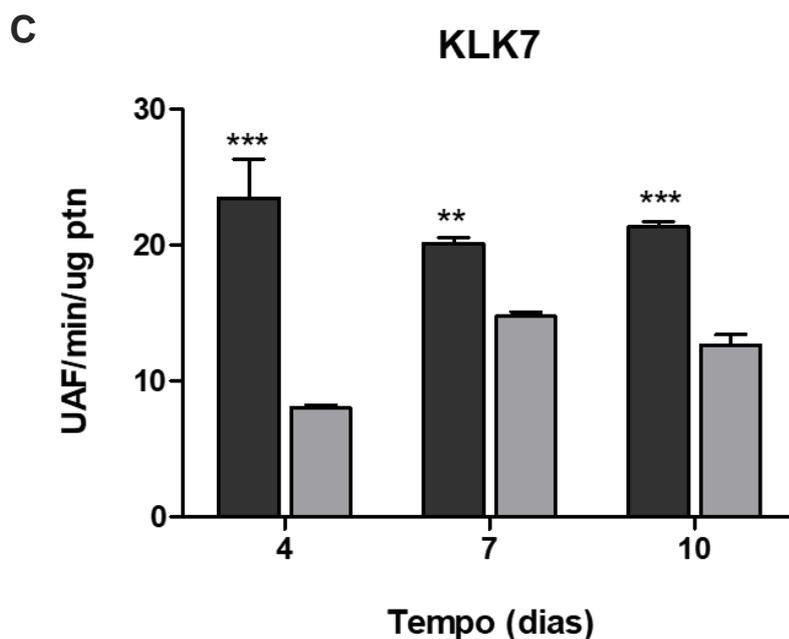


Fonte: do próprio autor.

Para todas as KLK, em todos os períodos de tempo, exceto para KLK6 no dia 7, foi observada diferença significativa entre a atividade na epiderme e derme, de pelo menos 1,5 vez. A maior diferença na expressão das KLK entre essas duas camadas ocorreu no dia 4, com diferença de até 3 vezes (**Figura 18 A-C**). Não houve diferença entre a atividade das KLK na epiderme controle nos diferentes períodos de tempo.

Figura 18 - Atividade de KLK5, KLK6 e KLK7 na epiderme e derme. A atividade enzimática de KLK5 (A), KLK6 (B) e KLK7 (C) foi detectada na hidrólise de substratos FRET pelas proteínas presentes nos extratos de epiderme (queratinócitos basais) e derme (fibroblastos), em diferentes períodos (4, 7, 10 dias) de IAL. De modo geral, a atividade de KLK na epiderme foi superior à derme. As diferenças foram analisadas por ANOVA + pós-teste de Bonferroni e consideradas estatisticamente diferentes com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***), quando comparadas à derme no mesmo período de cultivo. UAF: unidade arbitrária de fluorescência; ptn: proteína;

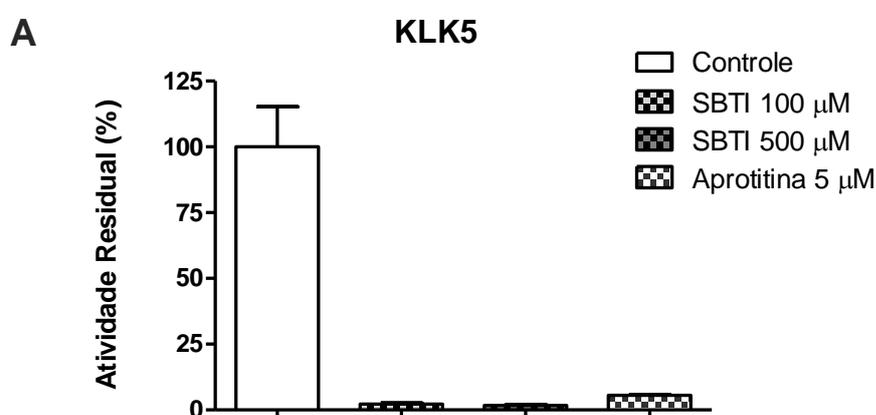




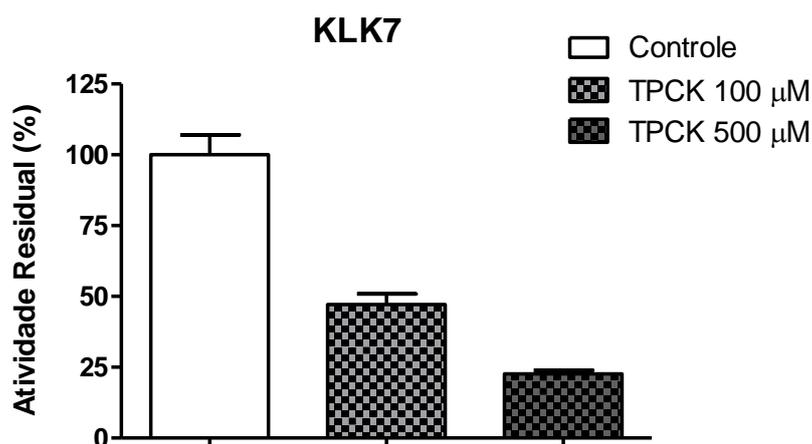
Fonte: do próprio autor.

Quanto à caracterização das enzimas com seus inibidores específicos, para KLK5, na presença de SBTI 100 e 500 μM ou aprotinina 5 μM , a atividade residual foi menor que 5% (**Figura 19A**). Para KLK7, observou-se diminuição de 40% da atividade residual na presença de TPCK 100 μM , e de 75% com TPCK 500 μM (**Figura 19B**), confirmando a especificidade do ensaio para a detecção da atividade de KLK na pele.

Figura 19 - Caracterização da atividade de KLK5 e KLK7 com o uso de inibidores. A caracterização da atividade de KLK5 (A) e KLK7 (B) foi realizada por meio de detecção de sua atividade residual na presença dos inibidores SBTI e aprotinina para KLK5 e TPCK para KLK7. Controle: CTM cultivadas bidimensionalmente em KSFM por 11 dias. KLK: calicreína tecidual; SBTI: Inibidor de tripsina de soja; TPCK: tosil-fenilalanil-clorometil cetona.



B

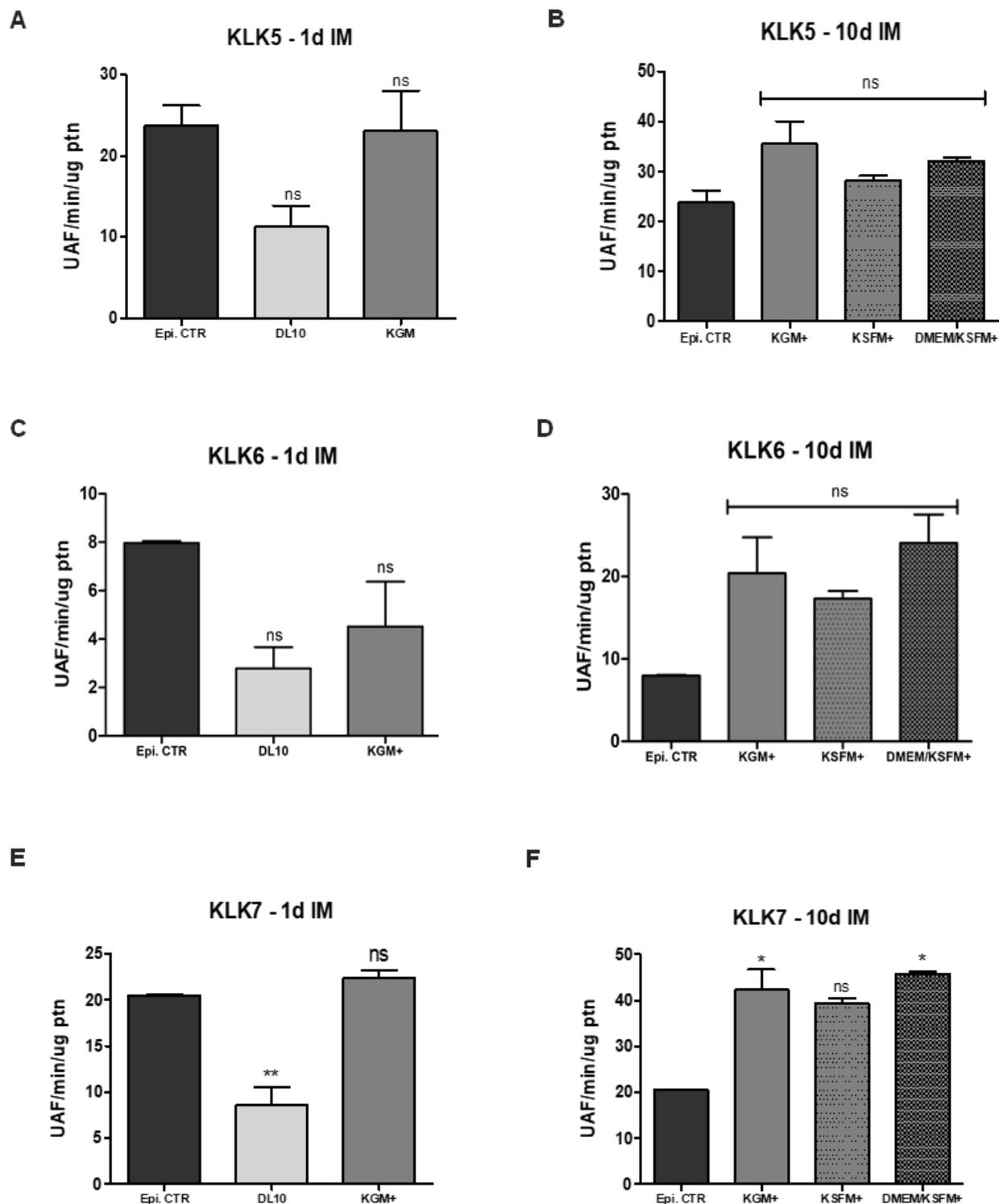


Fonte: do próprio autor (Santos et al, 2019)

Com relação à atividade de KLK nas potenciais epidermes formadas a partir de CTM, verificou-se que não há diferença significativa em relação à epiderme controle, formada a partir de queratinócitos basais, tanto para KLK5 (**Figura 20A**), KLK6 (**Figura 20C**) e KLK7 (**Figura 20E**) quando cultivadas nas mesmas condições, ou seja, 1 dia imersas em KGM/RAFT e depois cultivadas em IAL em meio RAFT. No entanto, apesar da atividade enzimática ser aparentemente menor que a epiderme formada por queratinócitos, as CTM cultivadas em meio DL10 também não apresentaram diferença significativa em relação à epiderme controle, exceto para atividade de KLK7.

Quando cultivadas por 10 dias em imersão e 10 dias de exposição à IAL, nos meios de diferenciação KGM, KSFM e DMEM/KSFM também não foi observada diferença significativa em relação à epiderme controle, para atividade de KLK5 (**Figura 20B**), KLK6 (**Figura 20D**) e KLK7 (**Figura 20F**), exceto para atividade de KLK7 para KGM e DMEM/KSFM que foi 2,1 e 2,2 vezes maior.

Figura 20 - Atividade de KLK5, KLK6 e KLK7 nas CTM induzidas à diferenciação epidérmica após 1 ou 10 dias de imersão. As CTM foram cultivadas por 1 (A, C e E) ou 10 (B, D, e F) dias em diferentes meios de diferenciação ou DL10 e expostas à IAL por 10 dias. A atividade enzimática de KLK5 (A e B), KLK6 (C e D) e KLK7 (E e F) nos extratos celulares foi determinada na hidrólise de seus respectivos substratos. Epi CTR: epiderme controle formada a partir de queratinócitos basais. ns: sem diferença significativa. $p < 0,05$ (*), comparada ao controle. KLK: calicreína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; min: minuto; ptn: proteína.



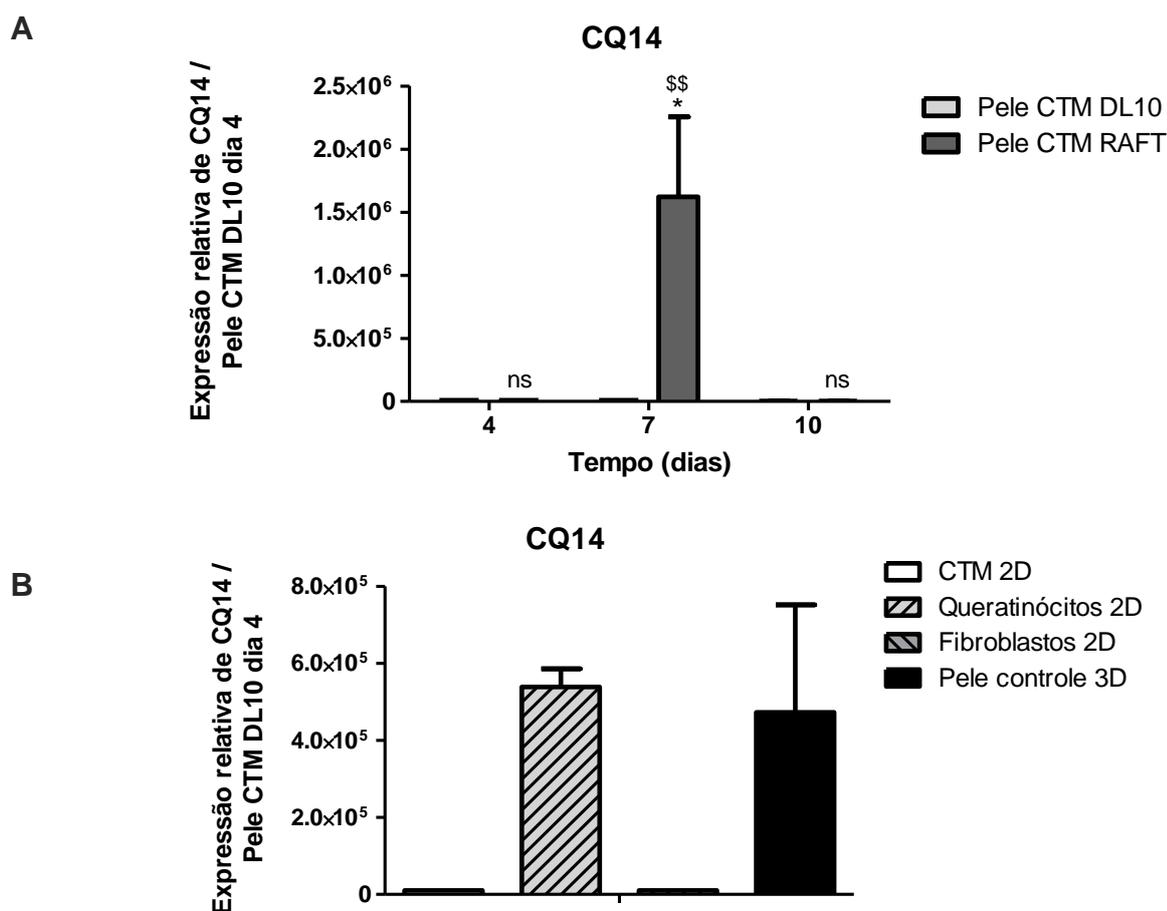
Fonte: do próprio autor.

4.4.1.4 Expressão de proteínas epidérmicas

A expressão da CQ14 e CQ10, presentes no estrato basal e suprabasal, respectivamente, da epiderme, foi avaliada nas amostras após diferentes períodos de exposição à IAL. A expressão de CQ14 foi verificada no 7º dia de cultura nas

potenciais epidermes obtidas com CTM cultivadas em KGM/RAFT, não sendo verificada expressão significativa nos outros períodos analisados (**Figura 21A**), quando comparadas às CTM cultivadas em DL10 no mesmo dia de IAL. A ausência da expressão dessa proteína também foi verificada nas CTM e fibroblastos cultivados com DL10 em 2D. Queratinócitos basais expressaram CQ14, assim como a pele controle 3D, provavelmente, devido à presença de queratinócitos basais em sua camada germinativa (**Figura 21B**).

Figura 21 - Expressão de CQ14 em peles formadas por CTM e células 2D. As CTM foram cultivadas em meio DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias (A). CTM, fibroblastos e queratinócitos mantidos em meio para cultura 2D também foram analisados, assim como pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às células cultivadas em DL10 no primeiro dia. (*) Diferente em relação à pele CTM DL10 no mesmo período de cultivo ($p < 0,05$). (**) Diferente em relação ao dia 4. ns: sem diferença significativa.



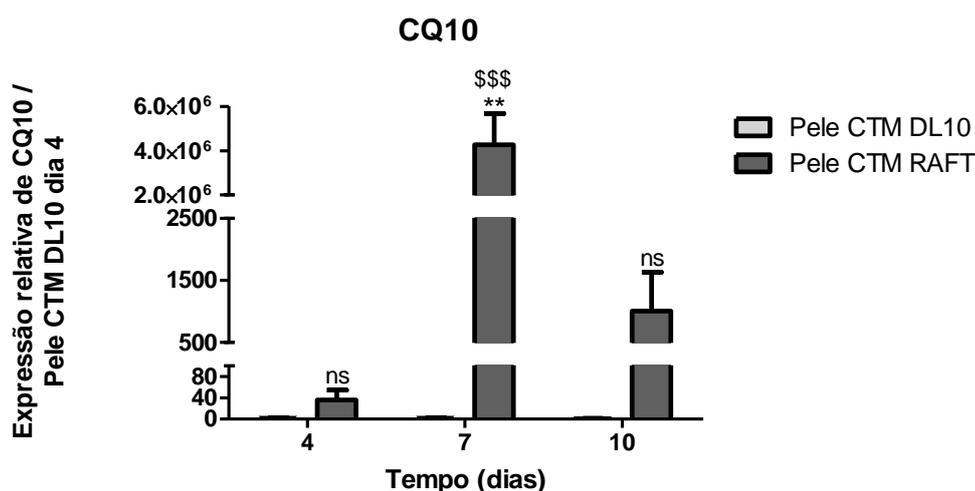
Fonte: do próprio autor.

Também no 7^o dia de IAL foi verificado aumento da expressão de CQ10 nas peles contendo CTM induzidas à diferenciação e, apesar de não ser diferente, no 10^o

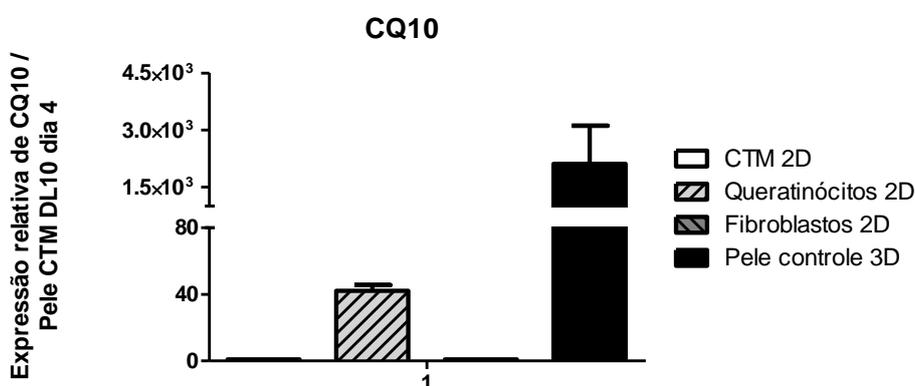
dia de cultura em IAL ainda é possível observar significativa expressão dessa proteína, a qual é ausente nas CTM cultivadas em DL10 (**Figura 22A**) nos mesmos períodos. A expressão verificada no 4º dia de cultura é similar à expressão em queratinócitos basais, o que sugere comprometimento dessas células com a linhagem epidermal no início do período de cultura, o que não ocorre nas CTM e fibroblastos cultivados em DL10. A pele controle apresentou expressão dessa proteína 55 vezes maior do que os queratinócitos basais (**Figura 22B**).

Figura 22 - Expressão de CQ10 em peles formadas por CTM e células 2D. (A) CTM cultivadas em DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias. (B) CTM, fibroblastos e queratinócitos cultivados em 2D e pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às peles com CTM cultivadas em DL10 no primeiro dia. (**). Diferente em relação ao DL10 no mesmo período de cultivo ($p < 0,01$). (\$\$\$) Diferente em relação a pele CTM DL10 dia 4 ($p < 0,001$).

A



B

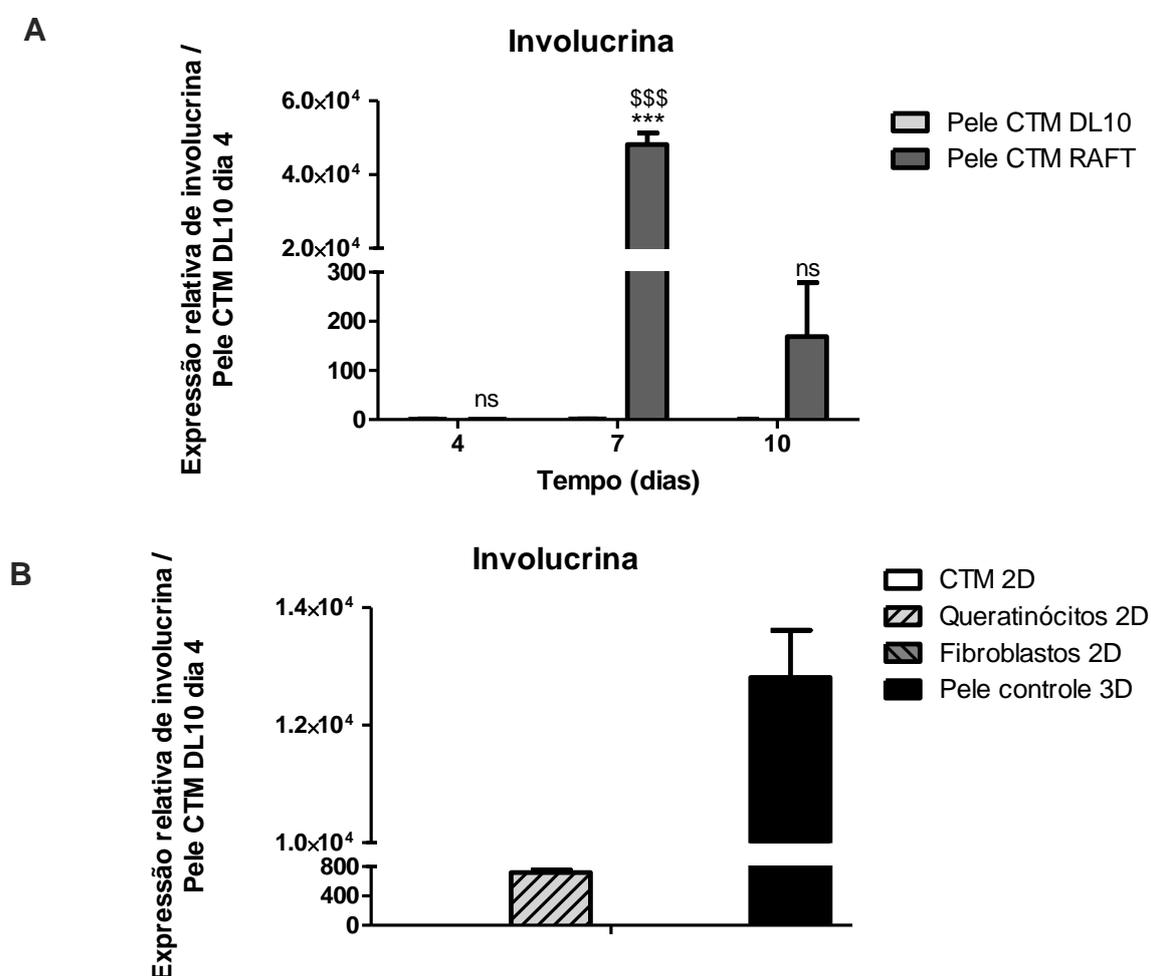


Fonte: do próprio autor.

A expressão de involucrina também foi investigada após 4, 7 e 10 dias de exposição à IAL. Assim como a CQ10, a involucrina teve sua expressão aumentada

no 7º dia nas peles com CTM induzidas à diferenciação (Pele MSC RAFT), quando comparadas as peles com CTM cultivadas em DL10 (Pele MSC DMEM) (**Figura 23 A**). Queratinócitos basais cultivados bidimensionalmente apresentaram expressão de involucrina 16,3 vezes menor que a pele controle, que é confeccionada com essas células. As CTM cultivadas bidimensionalmente em DL10 não apresentaram expressão de involucrina (**Figura 23B**).

Figura 23 - Expressão de involucrina em peles formadas por CTM e células 2D. (A) Peles com CTM cultivadas em DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias em IAL. (B) CTM, fibroblastos e queratinócitos cultivados em 2D, e pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às peles com CTM cultivadas em DL10 no primeiro dia. (***) Diferente em relação a pele CTM DL10 no mesmo período de cultivo ($p < 0,001$); (\$\$\$) Diferente em relação a pele CTM DL10 dia 4 ($p < 0,001$).



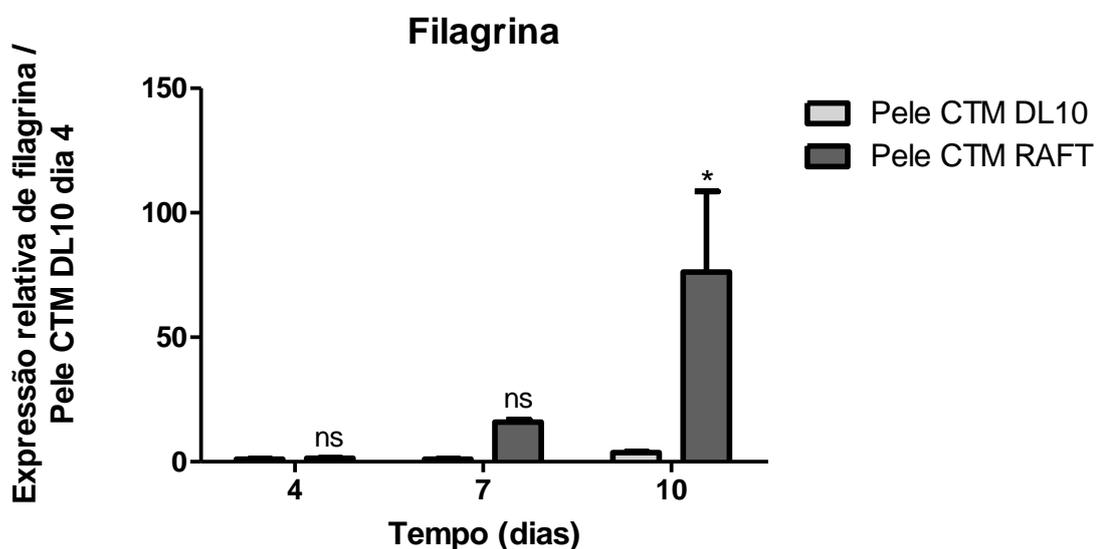
Fonte: do próprio autor.

Já a expressão de filagrina apresentou perfil de expressão diferente das proteínas apresentadas anteriormente. Essa proteína, presente na última camada da

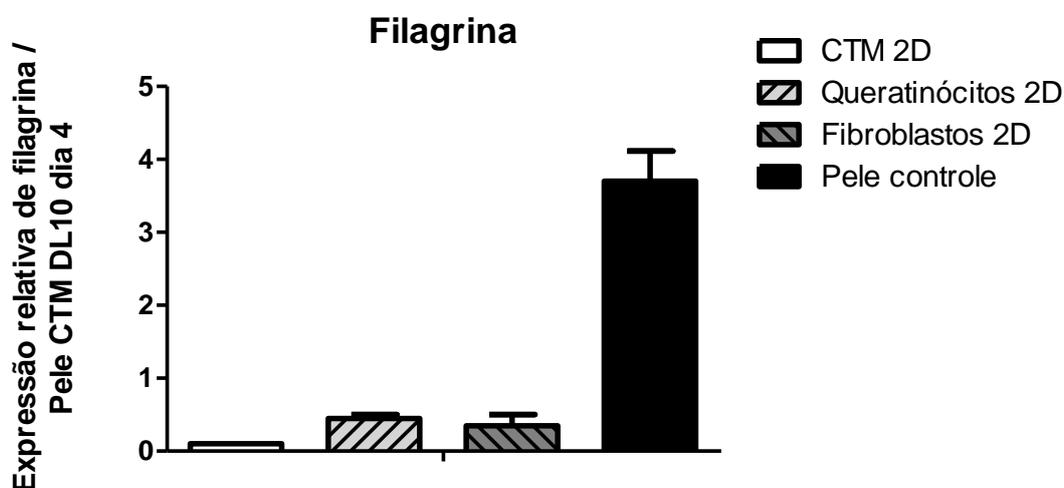
epiderme, apresentou aumento de sua expressão no final do período de análise (10 dias) nas CTM induzidas à diferenciação (**Figura 24A**). Novamente, queratinócitos basais cultivados bidimensionalmente apresentam expressão de filagrina 8,2 vezes menor que a pele controle. As CTM cultivadas em 2D em DL10 não apresentaram expressão de filagrina (**Figura 24B**).

Figura 24 - Expressão de filagrina em peles formadas por CTM e em células cultivadas em 2D. (A) CTM cultivadas em DL10 ou KGM/RAFT por 4, 7 e 10 dias. (B) CTM, fibroblastos e queratinócitos cultivados em 2D e pele controle 3D. A expressão foi normalizada pela do gene constitutivo GAPDH e analisada em relação às peles com CTM cultivadas em DL10 no primeiro dia. (*) Diferente em relação ao DL10 no mesmo período de cultivo ($p < 0,01$).

A



B



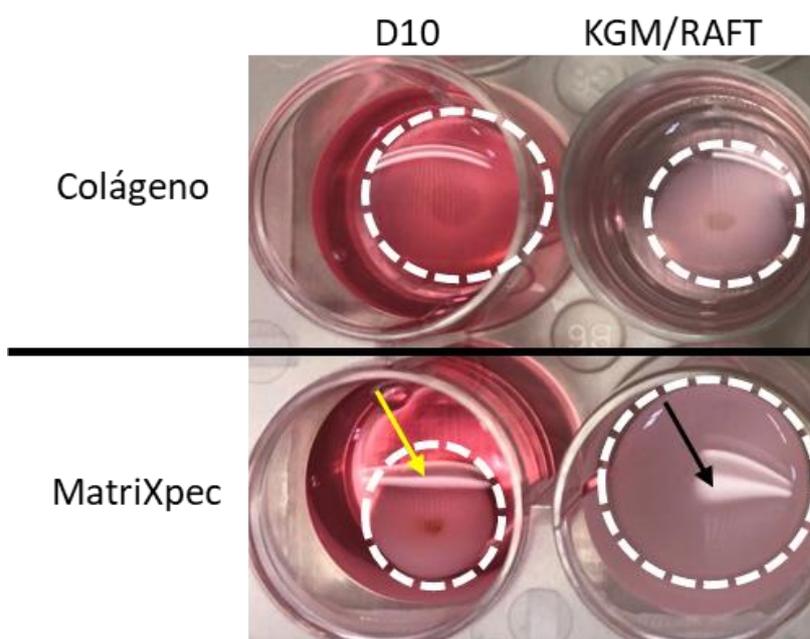
Fonte: do próprio autor.

4.4.2 Matrix descelularizada MatriXpec™

Considerando que o protocolo para confecção de pele 3D desenvolvido pela Profa. Dra. Silvy Stuchi resulta em uma epiderme diferenciada e estratificada, e que o tempo de 10 dias de imersão em meio de diferenciação apresentou células com perfil mais invasivo quando comparado ao 1 dia, optou-se por seguir somente com o protocolo de pele padrão, conforme **item 3.3.1**, para o desenvolvimento dos equivalentes epidérmicos sobre a matriz descelularizada MatriXpec™.

Macroscopicamente, as CTM cultivadas sobre o MatriXpec™ em DL10, diferentemente da matriz de colágeno, contraíram o *plug* formado (linhas brancas pontilhadas, **Figura 25**) de modo a quase fechá-lo (seta amarela, **Figura 25**), evidenciando que as CTM exibiram grande interação com esse material nessa condição, fenômeno não observado quando as células foram cultivadas em KGM/RAFT (seta preta, **Figura 25**).

Figura 25 - Fotografia das peles com CTM sobre colágeno ou MatriXpec™ após 1 dia de imersão. As CTM foram cultivadas como equivalente epidérmico (linha tracejada) sobre o colágeno ou MatriXpec™, e induzidas ou não à diferenciação em DL10 ou KGM/RAFT, respectivamente. É possível observar grande contração do MatriXpec™ quando as CTM são cultivadas sobre ele em DL10 (seta amarela), fenômeno não identificado quando essas células são cultivadas em KGM/RAFT sobre o mesmo suporte (seta preta).



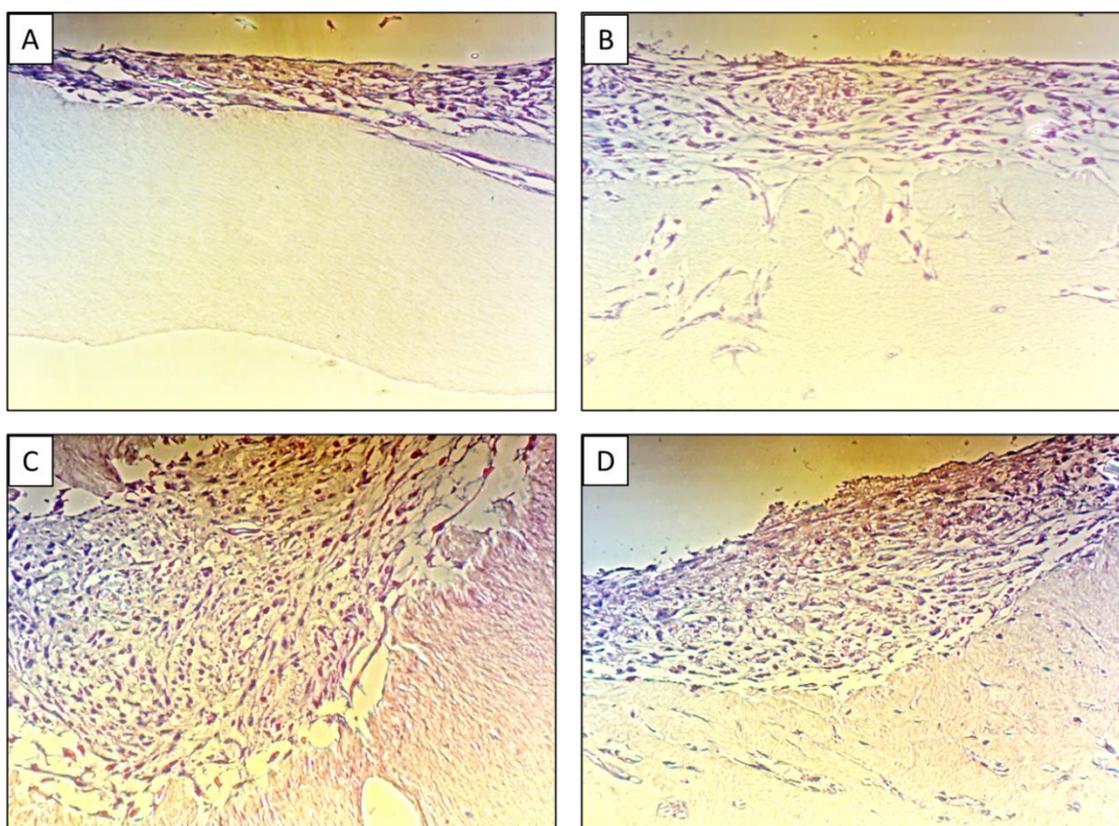
Fonte: do próprio autor.

4.4.2.1 Análise histológica

A análise histológica demonstrou que as CTM, quando cultivadas sobre o colágeno (**Figura 26A**), dispuseram-se como um tecido conjuntivo frouxo, de forma similar ao observado quando as CTM foram cultivadas sobre o equivalente dérmico de colágeno e fibroblastos (**item 4.4.1.1**). No entanto, seu cultivo sobre o MatriXpec™ induzidas a diferenciação (**Figuras 26B e 26D**) não apresentaram fenótipo de células epiteliais, que são cuboides e justapostas, mas

Ainda, MatriXpec™ em DL10, as células apresentaram migração/proliferação exacerbada em direção ao equivalente dérmico quando comparadas às CTM cultivadas sobre o colágeno (**Figura 26A**), evidenciando um perfil invasivo comumente encontrado em processos tumorais (**Figura 26C**).

Figura 26 - Fotomicrografia das CTM cultivadas como equivalente epidérmico sobre matriz de colágeno ou MatriXpec™. Após 10 dias de IAL, as CTM cultivadas sobre equivalente dérmico composto por colágeno (A e B) ou MatriXpec™ (C e D) em DL10 (A e C) ou KGM/RAFT (C e D). De maneira geral, as células apresentaram fenótipo típico de tecido conjuntivo frouxo. Ainda, as CTM cultivadas em DL10 sobre o MatriXpec™ migraram/proliferaram em direção a esse equivalente dérmico (C), diferentemente de quando são cultivadas sobre o colágeno (A). Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 200 x.

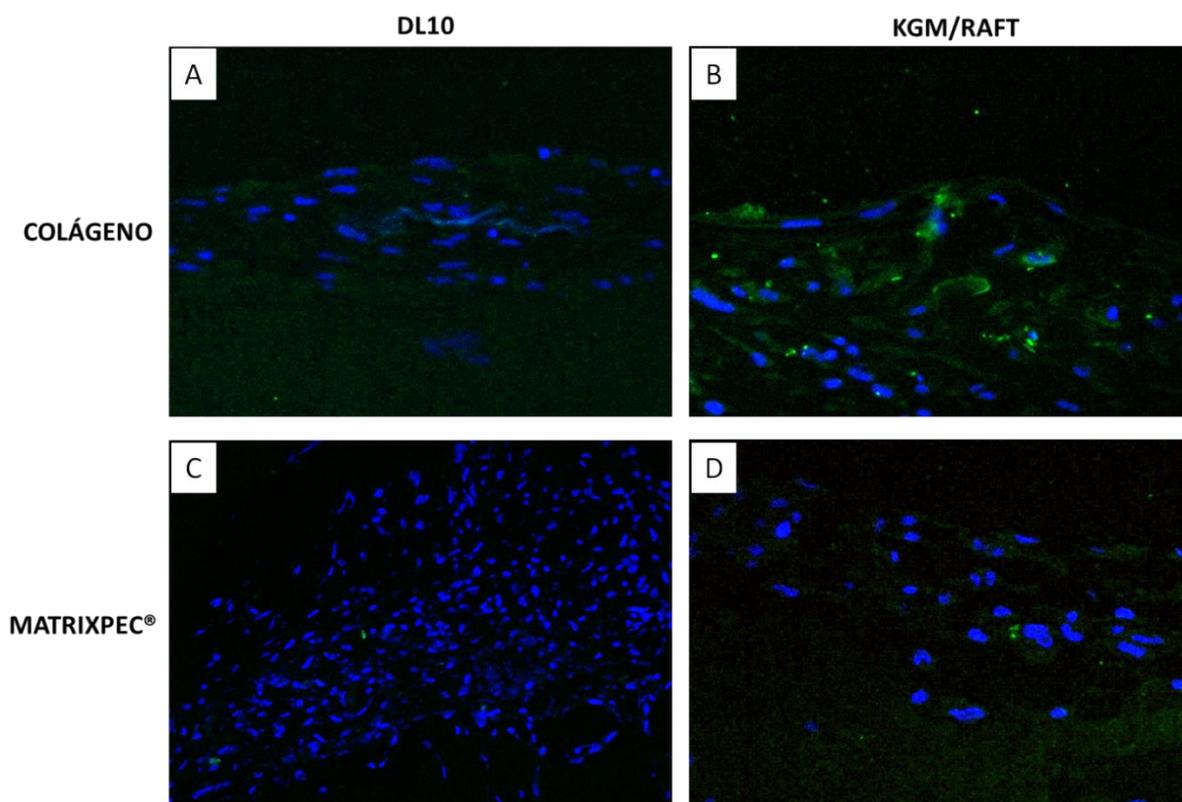


Fonte: do próprio autor.

4.4.2.2 Imunofluorescência para CQ5, CQ10 e involucrina

As CTM, quando cultivadas em DL10 sobre o colágeno ou MatriXpec™ (Figuras 27A e 27C, respectivamente), não foram marcadas positivamente para a CQ5, encontrada na camada basal da epiderme. No entanto, apesar da marcação discreta, ela esteve presente nas CTM induzidas à diferenciação sobre o *plug* de colágeno (Figura 27B), apesar de não estrato-específica. Tal expressão não foi verificada quando essas células foram cultivadas sobre o MatriXpec™ (Figura 27D)

Figura 27 - Expressão de CQ5 detectada por imunofluorescência nas epidermes formadas a partir de cultivo de CTM sobre equivalente dérmico. (A) CTM cultivadas em DL10 em matriz de colágeno; (B) CTM induzidas à diferenciação em matriz de colágeno; (C) CTM cultivadas em DL10 em MatriXpec™; (D) CTM induzidas à diferenciação em MatriXpec™. Aumento de 200 x.

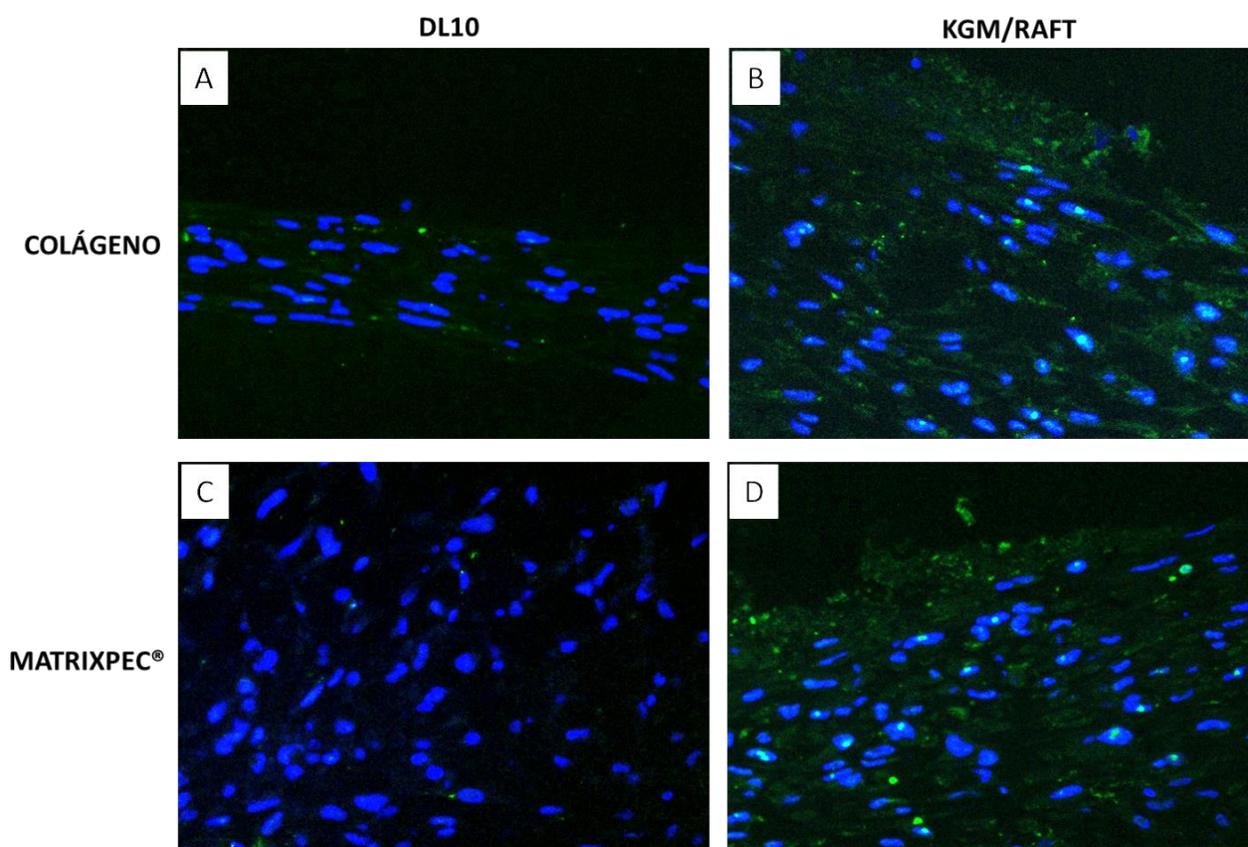


Fonte: do próprio autor.

A CQ10, citoqueratina encontrada nas camadas suprabasais da epiderme, não foi identificada quando as CTM foram cultivadas sobre colágeno (Figura 28A) ou

MatriXpec™ (**Figura 28C**) em DL10. No entanto, quando induzidas à diferenciação sobre essas matrizes uma baixa expressão foi identificada tanto ao utilizar tanto o colágeno (**Figura 28B**), quanto o MatriXpec™ como suportes dérmicos (**Figura 28D**).

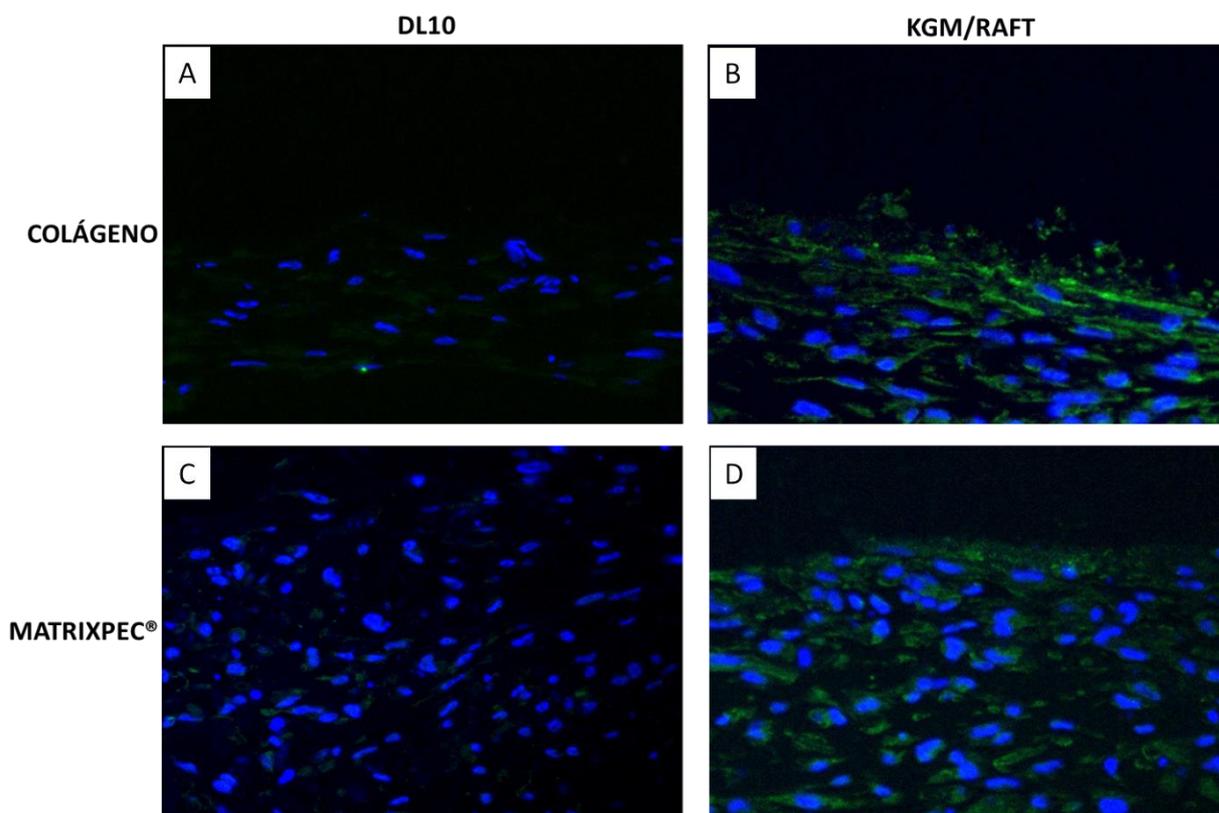
Figura 28 - Expressão de CQ10 detectada por imunofluorescência nas epidermes formadas a partir de cultivo CTM sobre equivalente dérmico. (A) CTM cultivadas em DL10 em matriz de colágeno; (B) CTM induzidas à diferenciação em matriz de colágeno; (C) CTM cultivadas em DL10 em MatriXpec™; (D) CTM induzidas à diferenciação em MatriXpec™. Aumento de 200 x.



Fonte: do próprio autor.

A expressão de involucrina não foi identificada quando as CTM foram cultivadas em DL10, seja sobre o colágeno (**Figura 29A**) ou MatriXpec™ (**Figura 29C**). Ao serem induzidas a diferenciação sobre o colágeno apresentaram expressão de involucrina que, apesar de não exacerbada, está localizada, principalmente, nas camadas mais superiores do tecido (**Figura 29B**). Essa expressão também foi, minimamente, encontrada nas células diferenciadas sobre o MatriXpec™, e está distribuída, aleatoriamente, entre as células (**Figura 29D**).

Figura 29 - Expressão de involucrina detectada por imunofluorescência nas epidermes formadas a partir cultivo de CTM sobre equivalente dérmico. (A) CTM cultivadas em DL10 em matriz de colágeno; (B) CTM induzidas à diferenciação em matriz de colágeno; (C) CTM cultivadas em DL10 em MatriXpec™; (D) CTM induzidas à diferenciação em MatriXpec™. Aumento de 200 x.



Fonte: do próprio autor.

4.4.2.3 Atividade Enzimática de caliceínas teciduais

Após 10 dias de exposição à IAL, CTM induzidas à diferenciação epidérmica foram avaliadas quanto a atividade de KLK5 e KLK7 em comparação com as amostras cultivadas em DL10, tanto sobre o colágeno quanto sobre o MatriXpec™.

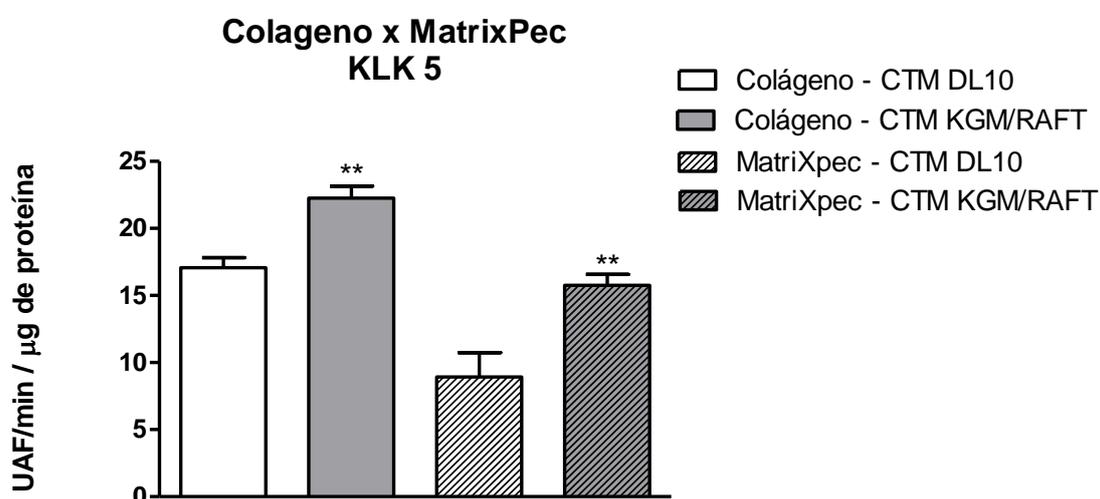
A atividade de KLK5 foi 1,3 vezes maior nas células induzidas à diferenciação sobre o colágeno e 1,8 vezes maior sobre o MatriXpec™, quando comparadas às amostras cultivadas em DL10 (**Figura 30A**). A atividade de KLK5 encontrada nas CTM cultivadas sobre o colágeno foi 1,4 vezes maior que nas células cultivadas sobre o MatriXpec™ nas mesmas condições.

Já para KLK7, a atividade nas células diferenciadas sobre o MatriXpec™ foi de 5,3 vezes maior que nas células não induzidas à diferenciação sobre o mesmo suporte dérmico. Na matriz de colágeno, foi detectada atividade 1,9 vezes maior nas células

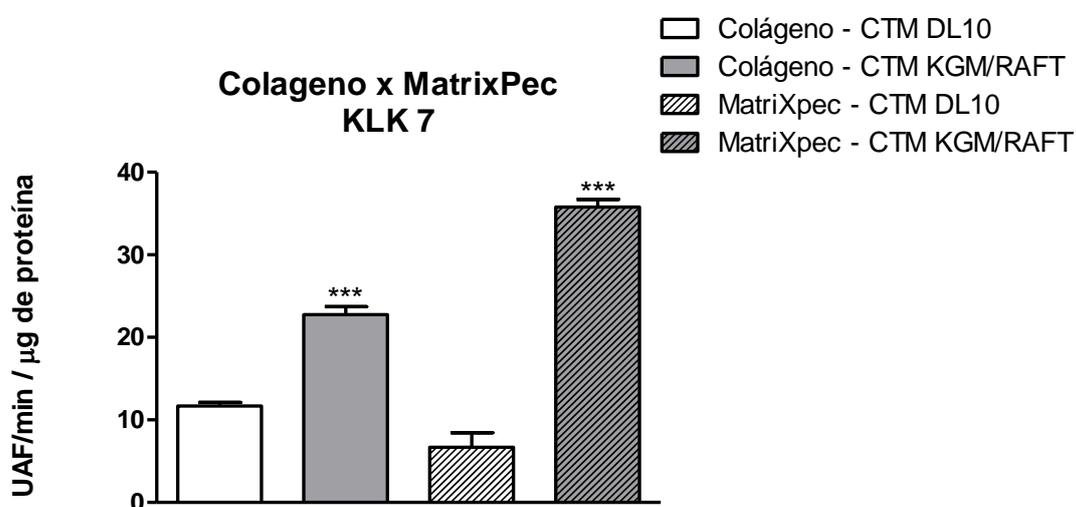
induzidas à diferenciação em relação às células cultivadas em DL10 no mesmo período. Ainda, tal atividade foi 2,8 vezes maior nas células cultivadas sobre MatriXpec™ em relação às células cultivadas sobre colágeno, no mesmo período (Figura 30B).

Figura 30 - Atividade de KLK5 e KLK7 nas CTM induzidas à diferenciação epidérmica sobre colágeno ou MatriXpec™. Atividade enzimática de (A) KLK5 e (B) KLK7 determinada na hidrólise de seus respectivos substratos, em CTM cultivadas sobre o equivalente dérmico de colágeno ou MatriXpec™. $\rho < 0,01$ (**) e $\rho < 0,001$ (***) Diferença comparada à CTM cultivadas com DL10 sobre o mesmo suporte dérmico. KLK: calicreína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; min: minuto; ptn: proteína.

A



B



Fonte: do próprio autor.

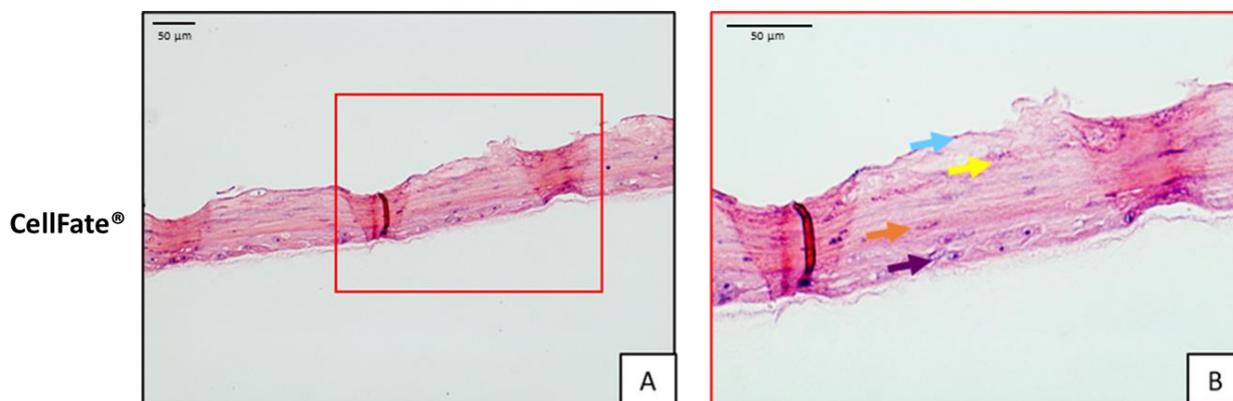
4.4.3 Scaffold de nanocelulose CellFate®

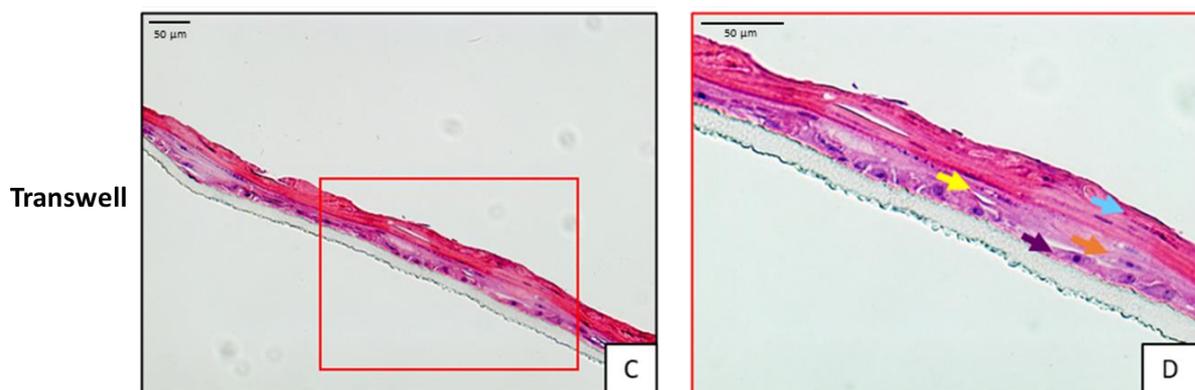
4.4.3.1 Análise histológica

Quando queratinócitos basais foram induzidos a diferenciação sobre o CellFate® (**Figuras 31A/B**), observou-se proliferação e estratificação muito similar à RHE controle (**Figuras 31C/D**), apresentando células pavimentosas justapostas características da camada basal (seta roxa), células mais alongadas com aspecto espinhoso, características da camada espinhosa (seta amarela), células contendo grânulos basofílicos, característicos da camada granulosa (seta laranja) e uma barreira de células anucleadas e queratinizadas, características da córnea (seta azul) da epiderme, demonstrando que o CellFate® apresenta estrutura e composição adequadas para a produção de RHE *in vitro*, quando utilizados queratinócitos basais.

A RHE controle (**Figuras 31 C/D**) resultou em uma epiderme estratificada com todas as camadas, ainda que pouco desenvolvidas. É possível verificar, tanto na epiderme controle quanto na produzida com CellFate®, a presença de núcleos na camada córnea, o que caracteriza paraqueratose e demanda a otimização dos protocolos no sentido de obter uma epiderme terminalmente diferenciada e saudável.

Figura 31 - Fotomicrografia dos queratinócitos cultivados sobre a matriz CellFate® ou transwell. (A) Queratinócitos basais cultivados sobre o CellFate® (A/B) ou sobre o transwell (C/D) em meio de diferenciação e expostos à IAL por 10 dias. Em ambos suportes, as células foram capazes proliferar e formar uma estrutura estratificada, apresentando as camadas: basal (setas roxas), espinhosa (setas laranjas), granulosa (setas amarelas) e córnea (setas azuis). Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A e C) e 200 x (B e D).





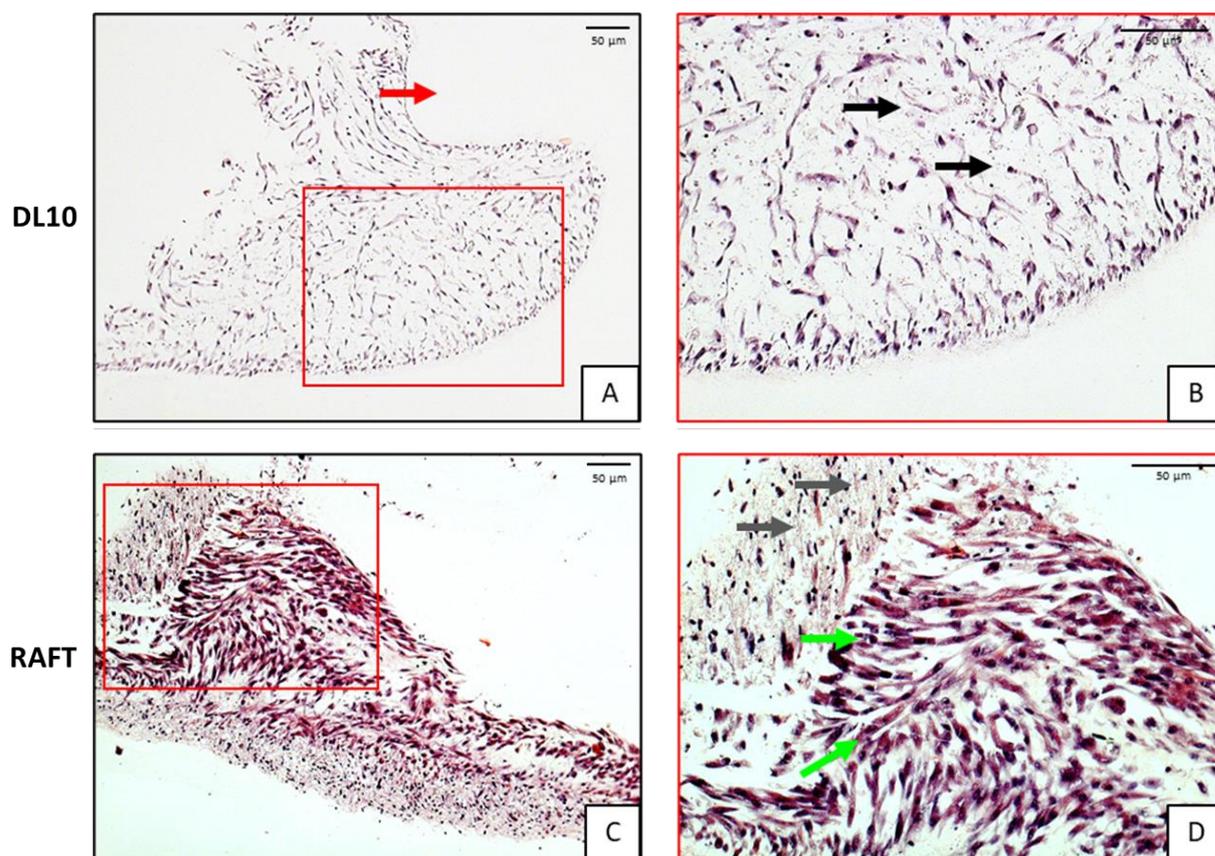
Fonte: do próprio autor.

Corroborando os dados obtidos anteriormente com MatriXpec™, as CTM cultivadas em meio de proliferação sobre o CellFate® (**Figuras 32A/B**) dispuseram-se aleatoriamente sobre a derme com um fenótipo similar a um tecido conjuntivo frouxo. A matriz extracelular apresentou coloração arroxeada, identificada pela hematoxilina, o que a caracteriza como basófila, possivelmente por conter muitas moléculas com grupamentos ácidos. É possível observar que as CTM foram capazes de promover a contração do CellFate® durante o período de cultivo (**Figura 32A**, seta vermelha), sugerindo que essas células possam ter alguma função no remodelamento tecidual, evento que ocorre no processo de cicatrização, por exemplo.

As CTM cultivadas em meio de diferenciação (**Figura 32C/D**) apresentaram fenótipo diferente das células cultivadas em meio de proliferação, tendo em vista que, na região mais próxima ao CellFate®, as células dispuseram-se irregularmente e produziram matriz extracelular rosácea (**Figura 32D**, seta cinza) que, histologicamente, apresentou consistência arenosa similar à uma matriz óssea primária, chamada de osteóide, onde, futuramente, pode ocorrer a deposição de sais de cálcio, tornando-a mineralizada.

Em direção ao centro do tecido formado, as células induzidas à diferenciação apresentaram-se mais alongadas, dispendo-se em feixes multidirecionados, com núcleos celulares alongados, com cromatina densa e organizados no mesmo sentido, dando um aspecto fusiforme às células (**Figura 32D**, seta cinza). Em regiões mais frouxas, é possível verificar a presença de substância amorfa fundamental levemente basófila preenchendo o espaço.

Figura 32 - Fotomicrografia das CTM cultivadas sobre a matriz CellFate®. CTM cultivadas em meio de proliferação (A/B) ou diferenciação (C/D) e expostas à IAL durante 10 dias. As CTM cultivadas em meio de proliferação apresentaram características de tecido conjuntivo (B, setas pretas), com células dispersas em matriz extracelular, e foram capazes de contrair a matriz (A, seta vermelha). Quando induzidas à diferenciação, as CTM secretaram matriz extracelular típica de diferenciação osteogênica nas extremidades (D, setas cinzas) ou apresentaram-se com núcleos alongados e organizadas em feixes multiparalelos (1D, setas verdes). Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x (A, C) e 200 x (B, D).

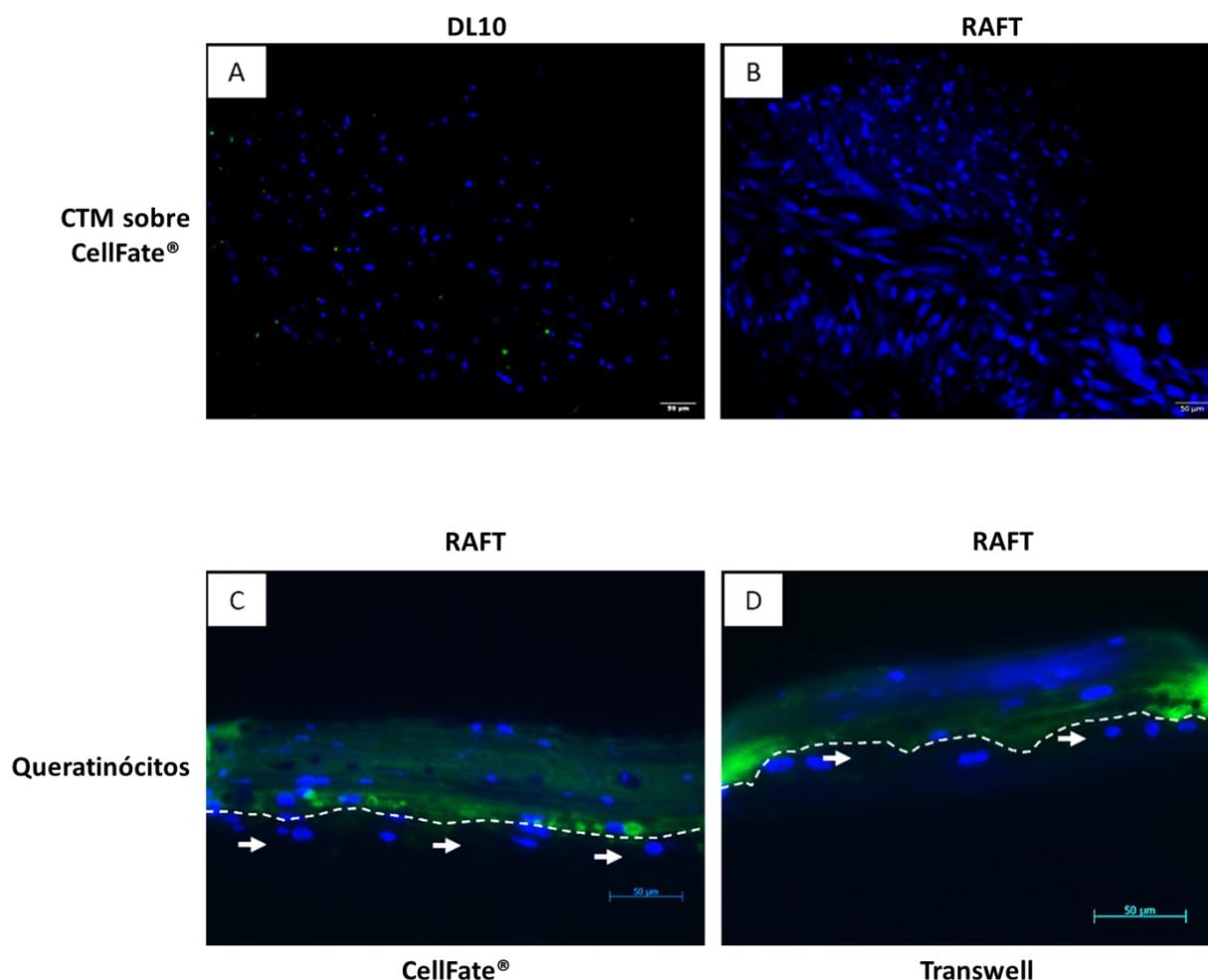


Fonte: do próprio autor.

4.4.3.2 Imunofluorescência para CQ10

Não foi identificada a expressão de CQ10 nas CTM cultivadas sobre o CellFate®, seja em meio de proliferação (**Figura 33A**) ou de diferenciação (**Figura 33B**). Contudo, quando os queratinócitos basais foram induzidos à diferenciação sobre o CellFate®, foi possível observar a presença de CQ10 nos estratos suprabasais (**Figura 33C**), assim como quando cultivadas sobre o transwell (**Figura 33D**, controle positivo). Na camada basal (região abaixo da linha pontilhada, **Figura 33C/D**), não foi identificada a expressão dessa proteína (setas brancas, **Figura 33C/D**), o que representa expressão estrato-específica bem definida.

Figura 33 - Expressão de CQ10 por imunofluorescência em equivalentes epidérmicos cultivados sobre o CellFate® ou transwell. (A) CTM cultivadas sobre o CellFate® em meio de proliferação ou (B) diferenciação e expostas à IAL por 10 dias. (C) Queratinócitos cultivados sobre o CellFate(r) ou (D) transwell, em modelo de RHE. Linha pontilhada: delimitação entre camada basal e suprabasal. Setas brancas: queratinócitos negativos para CQ10. Aumento de 100 x (A, B) e 200 x (C, D).



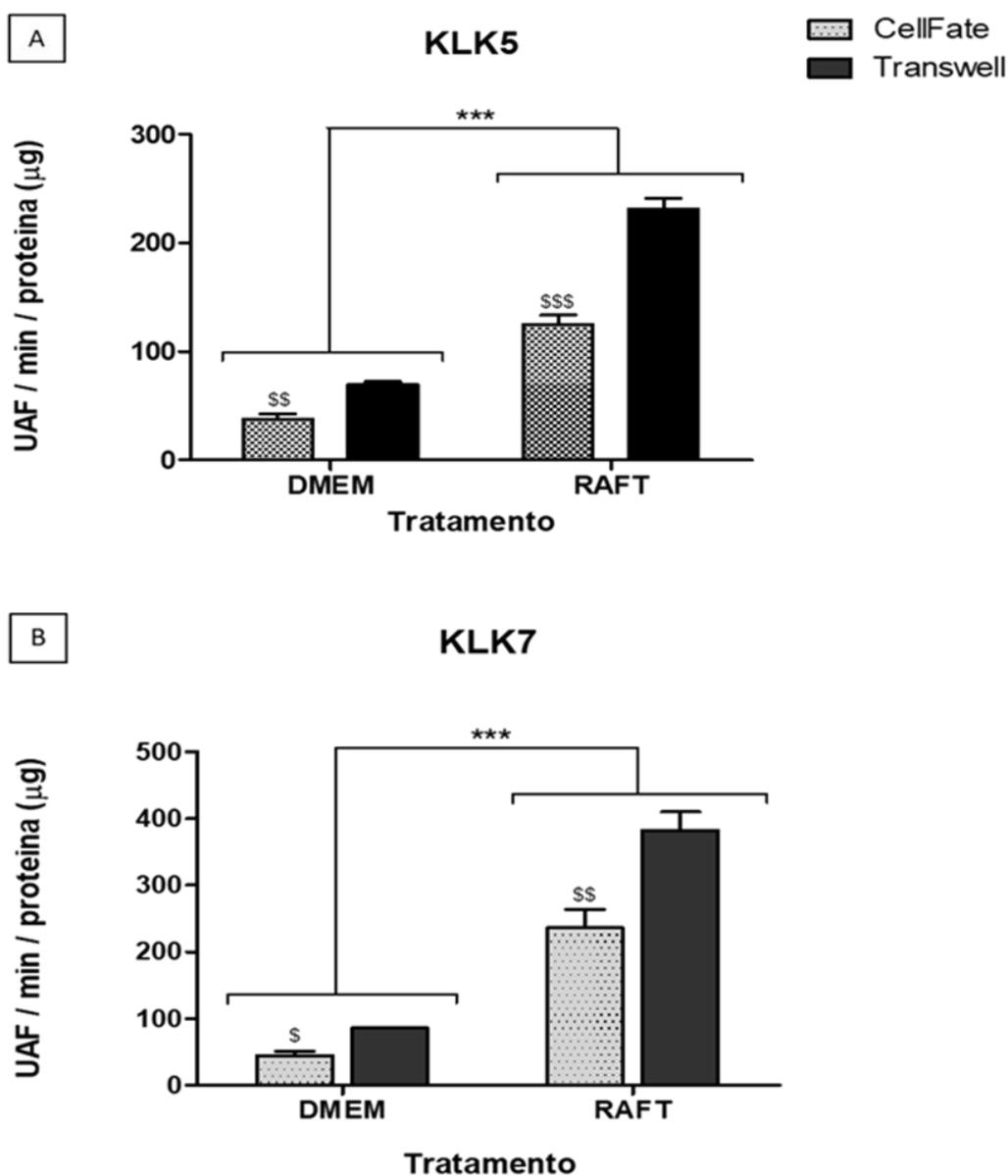
Fonte: do próprio autor.

4.4.3.3 Avaliação da atividade de calicreínas teciduais

De maneira geral, as CTM quando cultivadas em meio de proliferação sobre o CellFate® apresentaram atividade de KLK5 (**Figura 34A**) e KLK7 (**Figura 34B**) de 3,3 e 5,0 vezes menor quando comparadas às células cultivadas em meio RAFT, respectivamente, sugerindo que, nessa condição, as células poderiam estar comprometidas com a diferenciação epidérmica. A mesma razão foi identificada para atividade das duas KLK em meio de proliferação e diferenciação, quando essas

células foram cultivadas sobre a membrana polimérica transwell. No entanto, a atividade nas células cultivadas no transwell foi cerca de 1,8 vezes maior que as células cultivadas sobre o CellFate®.

Figura 34 - Atividade de KLK 5 e KLK7 nos extratos das CTM cultivadas sobre o CellFate® ou transwell. As CTM foram cultivadas por 10 dias em IAL em DL10 ou RAFT sobre a matriz CellFate® ou sobre a membrana polimérica transwell. A atividade enzimática de (A) KLK5 e (B) KLK7 presente nos extratos celulares foi determinada na hidrólise de seus respectivos substratos. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes com $\rho < 0,001$ (***) comparadas ao cultivo em DL10 ou RAFT no mesmo período, e $\rho < 0,001$ (\$\$\$), $\rho < 0,01$ (\$\$) ou $\rho < 0,05$ (\$) quando comparadas ao cultivo sobre o CellFate® ou transwell no mesmo período. KLK: caliceína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; min: minuto.



Fonte: do próprio autor.

4.4.4 Tela absorvível Integra®

4.4.4.1 *Análise histológica*

Em relação às análises histológicas das CTM cultivadas sobre a tela absorvível comercial Integra®, foi verificado que as células cultivadas em DL10 foram capazes de aderir às matrizes. Observou-se aumento da quantidade de núcleos corados com DAPI, conforme o tempo de cultivo, o que indica proliferação celular (**Figura 35**). Essa marcação nuclear também evidenciou a existência de células dentro das matrizes, o que se relaciona, possivelmente, ao potencial de migração das células de acordo com a porosidade e características dessa matriz. Curiosamente, ao final do período de cultivo, observou-se proliferação acima do limite do equivalente dérmico (**Figura 35I**), contudo mais análises devem ser realizadas a fim de se averiguar as características fenotípicas dessas células.

As células cultivadas em KSFM também proliferaram ao longo do tempo de cultivo, como também observado para o DMEM (**Figura 36**). No entanto, essa proliferação/migração celular foi, somente, em direção ao interior do equivalente dérmico (**Figura 36I**), e não em direção ao ar, como esperado para o processo de estratificação epidérmica.

Também foi verificado que a matriz Integra® possui autofluorescência verde, identificada nas **Figuras 35G** e **36G**, impossibilitando o uso de anticorpos que emitem a fluorescência nesse comprimento de onda (como FITC e Alexa Fluor 488), como os utilizados para marcação das proteínas epidérmicas nos experimentos anteriores.

Figura 35 - Fotomicrografias das CTM cultivadas sobre a matriz Integra® em DL10. CTM foram cultivadas por 1 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias em IAL em DL10 (controle negativo). Marcação azul: núcleos celulares. Linha tracejada: delimitação da matriz dérmica. Setas brancas: proliferação celular acima da matriz. Aumento de 100 x.

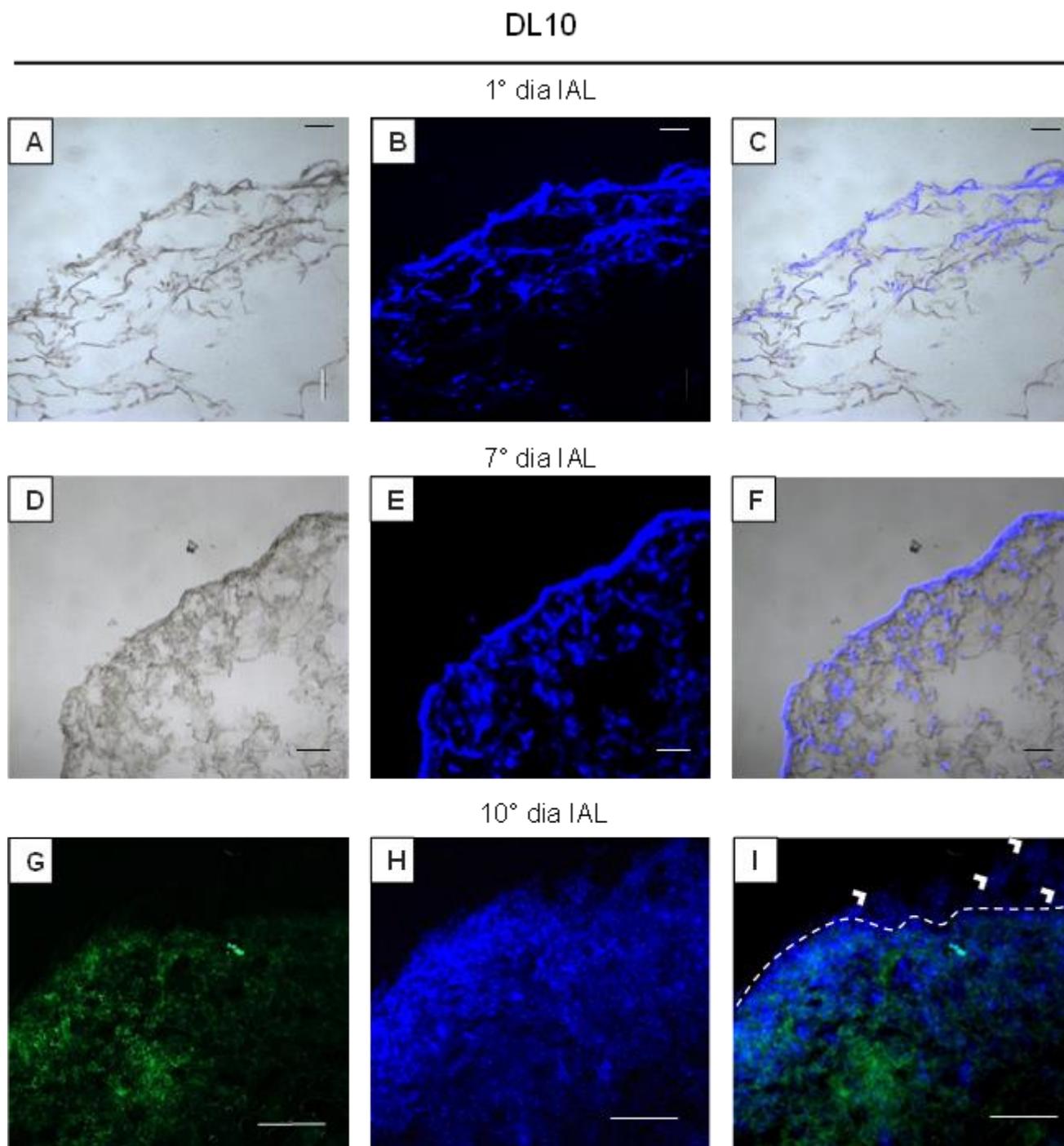
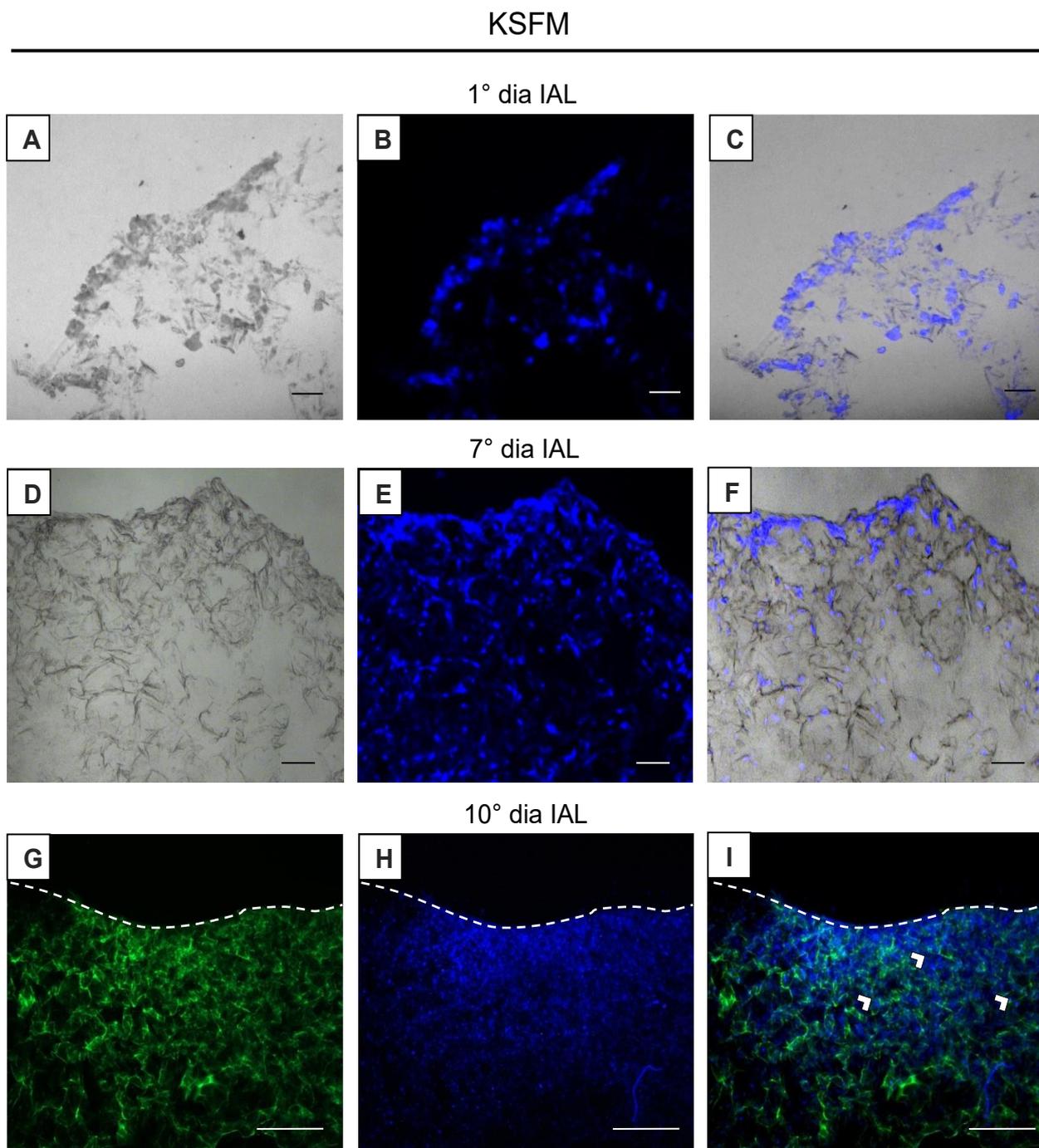


Figura 36 - Fotomicrografias das CTM cultivadas sobre a matriz Integra® em KSFM. CTM foram induzidas à diferenciação epidermal pelo cultivo em KSFM por 1 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias em IAL. Marcação azul: núcleos celulares corados com o corante Hoesch 33342. Linha tracejada: delimitação da matriz dérmica. Setas brancas: migração/proliferação celular em direção ao equivalente dérmico. IAL: interface ar-líquido. Aumento de 100 x.



Fonte: do próprio autor.

4.4.4.2 Atividade enzimática de calicreínas teciduais

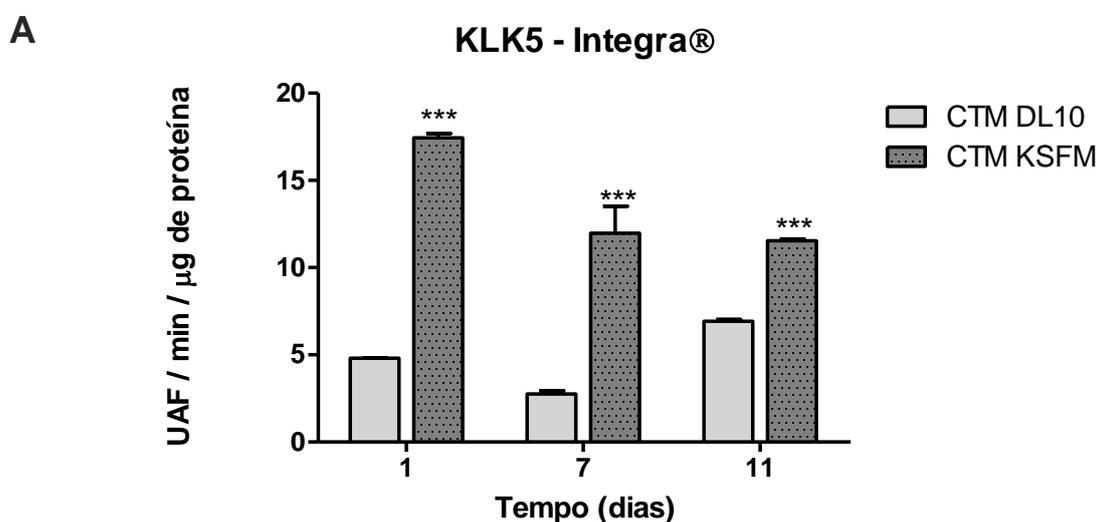
Em relação a atividade das KLK nas CTM cultivadas sobre a Integra®, verificou-se que a atividade de KLK5 foi, consideravelmente, maior (até 4,4 vezes) do que as cultivadas em DL10 no mesmo período de cultura (**Figura 37A**).

Já para KLK6, a atividade enzimática permaneceu, praticamente, constante durante todo o período de IAL para as células cultivadas em KSFM. As células cultivadas em DMEM apresentaram menor atividade de KLK6, variando de 1,4 vez o dia 1, 5,6 vezes para o dia 4 e 3,8 vezes menor para o dia 7, quando comparadas as CTM induzidas à diferenciação. (**Figura 37B**).

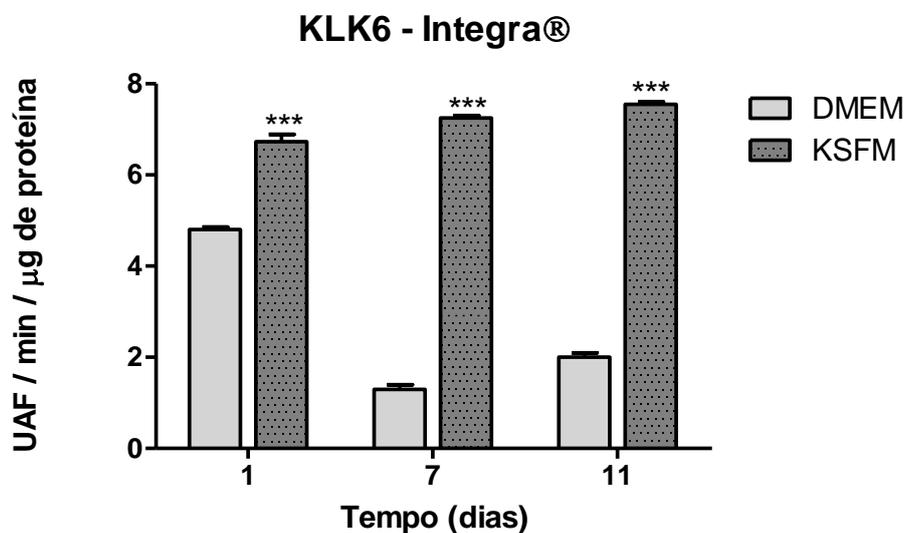
Resposta similar à KLK5 (Figura XA) foi observada para a atividade de KLK7(**Figura37C**) nas CTM cultivadas em KSFM, após 1 dia de exposição à IAL. Tal atividade foi de até 5,9 vezes maior quando comparada as CTM cultivadas em DL10. Nota-se uma pequena queda de até 0,6 vezes na atividade de KLK7 durante o período de cultura, para as CTM induzidas à diferenciação.

A média da atividade da KLK nas CTM cultivadas em KSFM sobre a matriz Integra® foram similares às encontradas para os queratinócitos basais induzidos à diferenciação terminal, conforme mostrado na **Figura 18**.

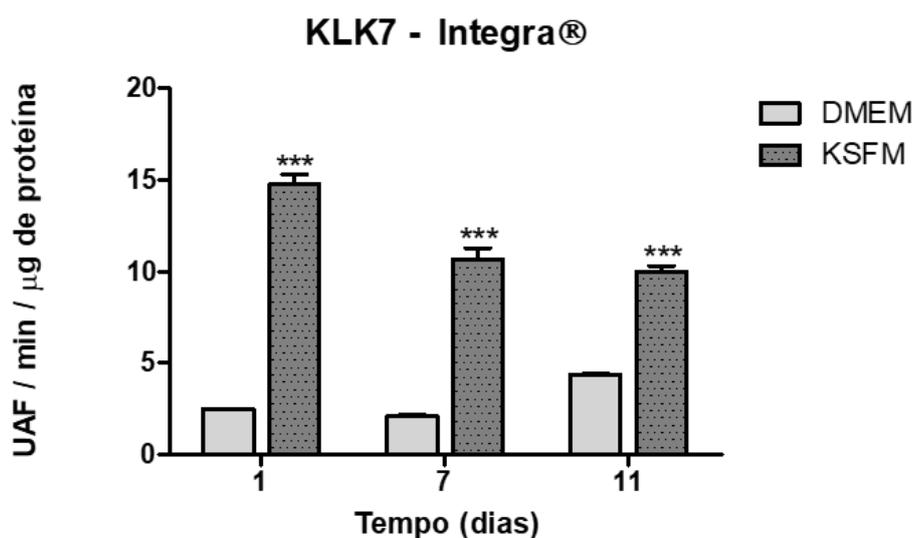
Figura 37 - Atividade de KLK 5, KLK6 e KLK7 nos extratos das CTM cultivadas sobre a matriz Integra®. A atividade enzimática de (A) KLK5, (B) KLK6 e (C) KLK7 foi quantificada nas CTM cultivadas por até 11 dias em DL10 ou KSFM. Estatisticamente significativo para (***) $p < 0,001$ e (**) $p < 0,01$, comparadas ao cultivo em DL10 no mesmo período. KLK: calicreína tecidual; UAF: unidade arbitrária de fluorescência; ptn: proteína.



B



C



Fonte: do próprio autor.

4.5 Investigação dos genes expressos por CTM no processo de cicatrização

Ao todo, foi avaliada a expressão de 84 genes envolvidos no processo de cicatrização (**APÊNDICE C**). Para a representação gráfica, foram escolhidos os 17 genes cuja expressão foi mais modulada positivamente entre os grupos experimentais, quando comparados ao controle (pele com queratinócitos), na ausência ou presença de ferida, nas CTM diferenciadas cultivadas em KGM (**Figura**

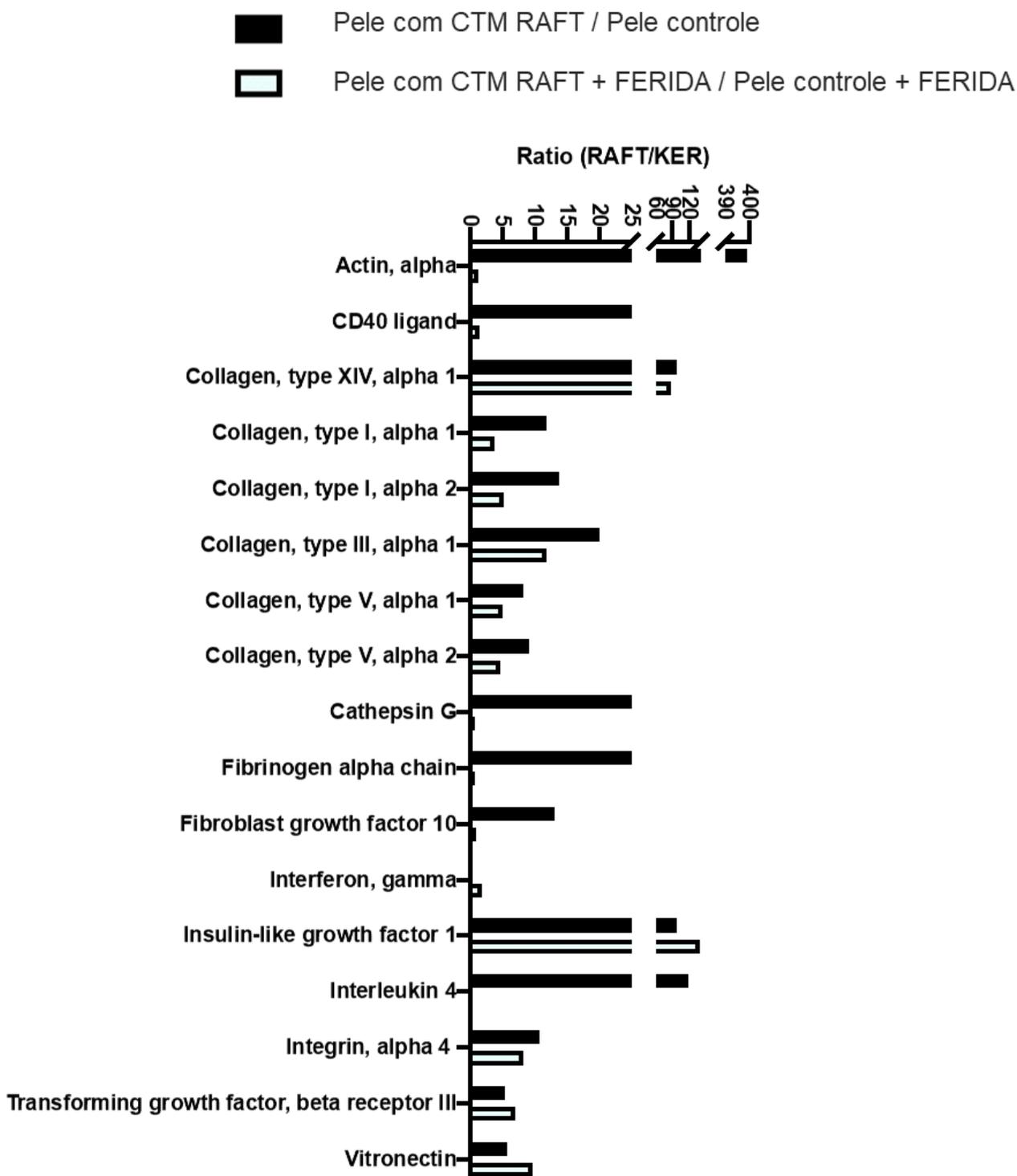
38), nas CTM não diferenciadas cultivadas em DL10 (**Figura 39**). A **Figura 40** representa a expressão desses genes nas CTM cultivadas em KGM em relação às cultivadas em DL10.

Quando as CTM foram induzidas à diferenciação, os genes mais modulados foram alfa actina, fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e colágeno tipo XIV (COL XIV), respectivamente. Na presença da ferida, a expressão de alfa actina foi bruscamente diminuída, assim como a de outros genes menos modulados, como CD40, catepsina G, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) 10 e cadeia alfa do fibrinogênio. A presença da ferida não alterou a expressão de COL XIV e IGF-1, assim como de vitronectina e fator de crescimento de fibroblasto beta 3 (TGF- β 3) (**Figura 38**).

Nas CTM cultivadas em DL10, integrina-beta 1 e quimiocina do tipo XCX também foram fortemente modulados nesse contexto. No entanto, quando essas amostras foram feridas, a expressão desses quatro genes foi abruptamente reduzida. Já a expressão dos genes COL XIV e IGF-1 aumentou em 1,2 e 2,4 vezes, respectivamente, enquanto FGF-7, TGF- β 3, e inibidor de metaloproteinase (TIMP) apresentou discreto aumento na expressão (**Figura 39**). Vale ressaltar que se trata de um experimento de sondagem para que, em um segundo momento, os genes de interesse sejam investigados estatisticamente.

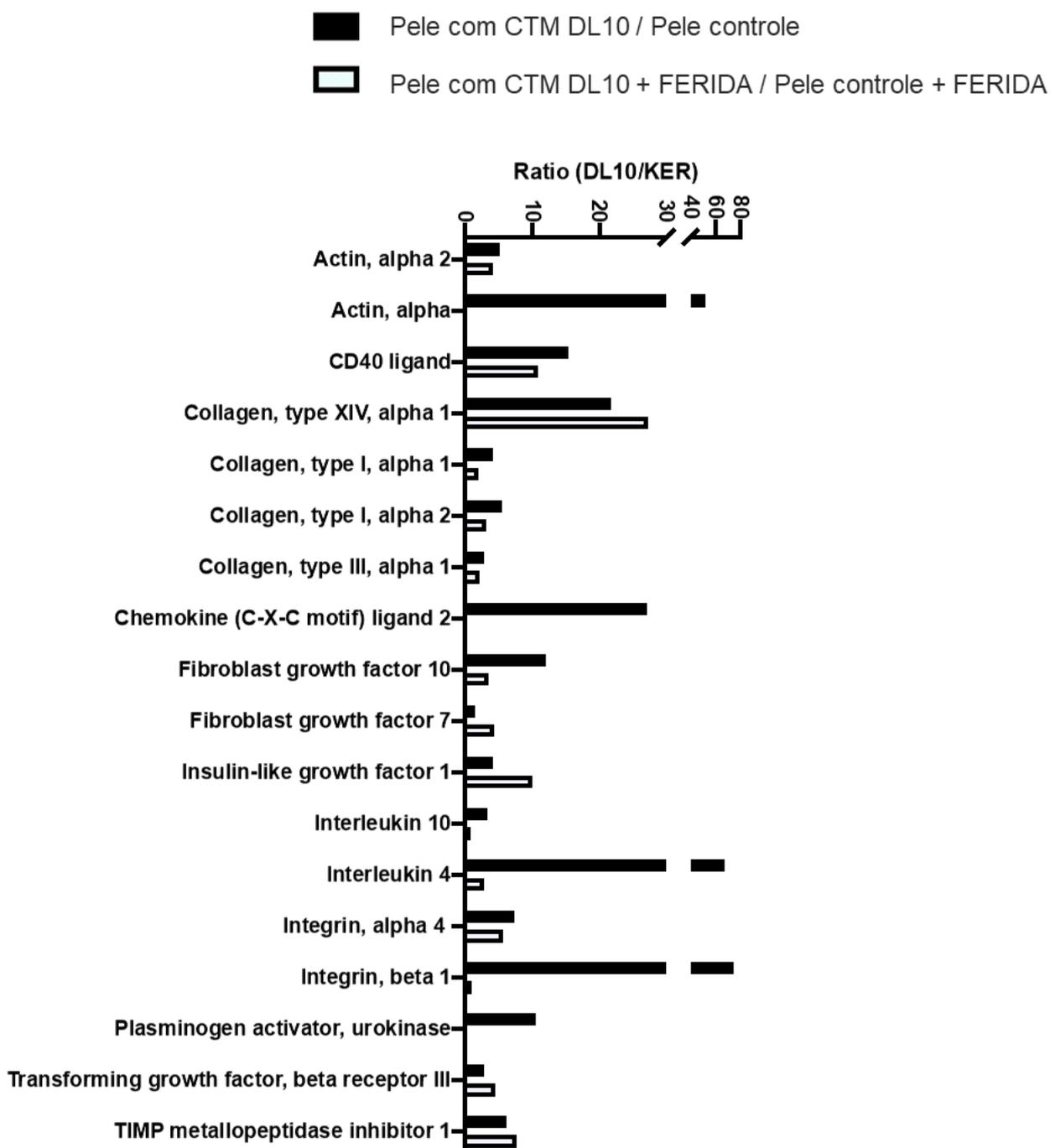
Diferenciar as CTM faz com que os genes que codificam a cadeia alfa do fibrinogênio e catepsina G sejam altamente expressos, genes esses que praticamente não sofrem modulação quando essas peles são feridas. Nesse caso, outros genes passam a ser altamente modulados, como caderina tipo 1, fator de coagulação III e integrina beta 6. Os genes que codificam a enzima metalopeptidase de matriz 7 (MMP-7) e o proto-oncogene Wnt-1 também são modulados positivamente. Interferon-gama que antes não era expresso, passa a ser modulado positivamente quando a pele formada por CTM diferenciadas é ferida (**Figura 40**).

Figura 38 - Genes envolvidos na cicatrização modulados nas peles contendo CTM induzidas à diferenciação, com ou sem ferida. Após 10 dias de IAL, ou 6 dias de exposição à ferida, as CTM cultivadas em RAFT foram avaliadas quanto seu perfil de expressão de genes envolvidos na cicatrização, comparadas a pele controle.



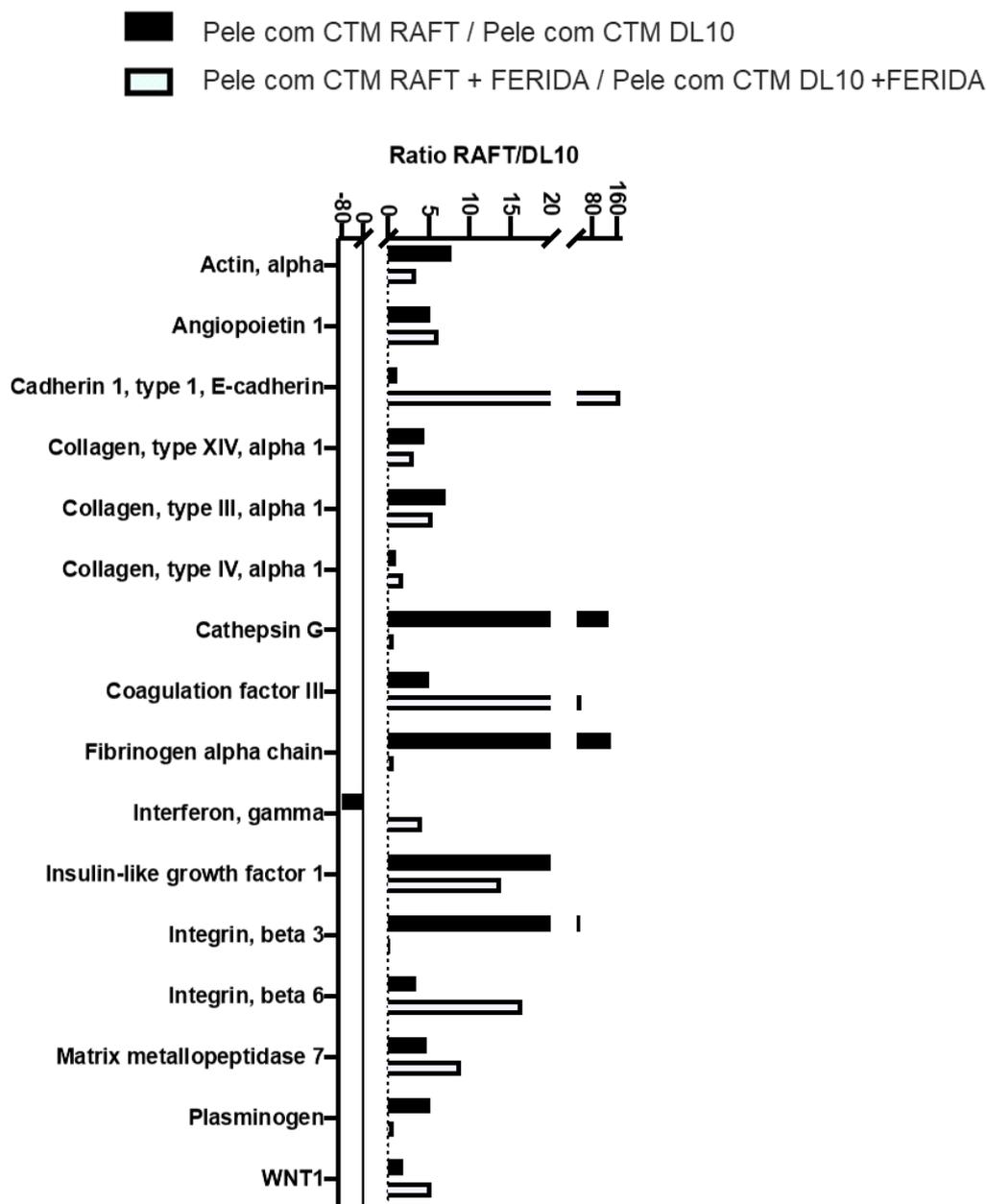
Fonte: do próprio autor.

Figura 39 - Genes envolvidos no processo cicatrização modulados nas peles contendo CTM não induzidas à diferenciação, com ou sem ferida. Após 10 dias de IAL, ou 6 dias de exposição à ferida, as CTM cultivadas em DL10 foram avaliadas quanto seu perfil de expressão de genes envolvidos na cicatrização, comparadas a pele controle.



Fonte: do próprio autor.

Figura 40 - Genes envolvidos no processo cicatrização modulados nas peles contendo CTM induzidas ou não à diferenciação epidermal, com ou sem ferida. Após 10 dias de IAL, ou 6 dias de exposição à ferida, as CTM cultivadas em RAFT foram avaliadas quanto seu perfil de expressão de genes envolvidos na cicatrização, comparadas as CTM cultivadas em DL10.

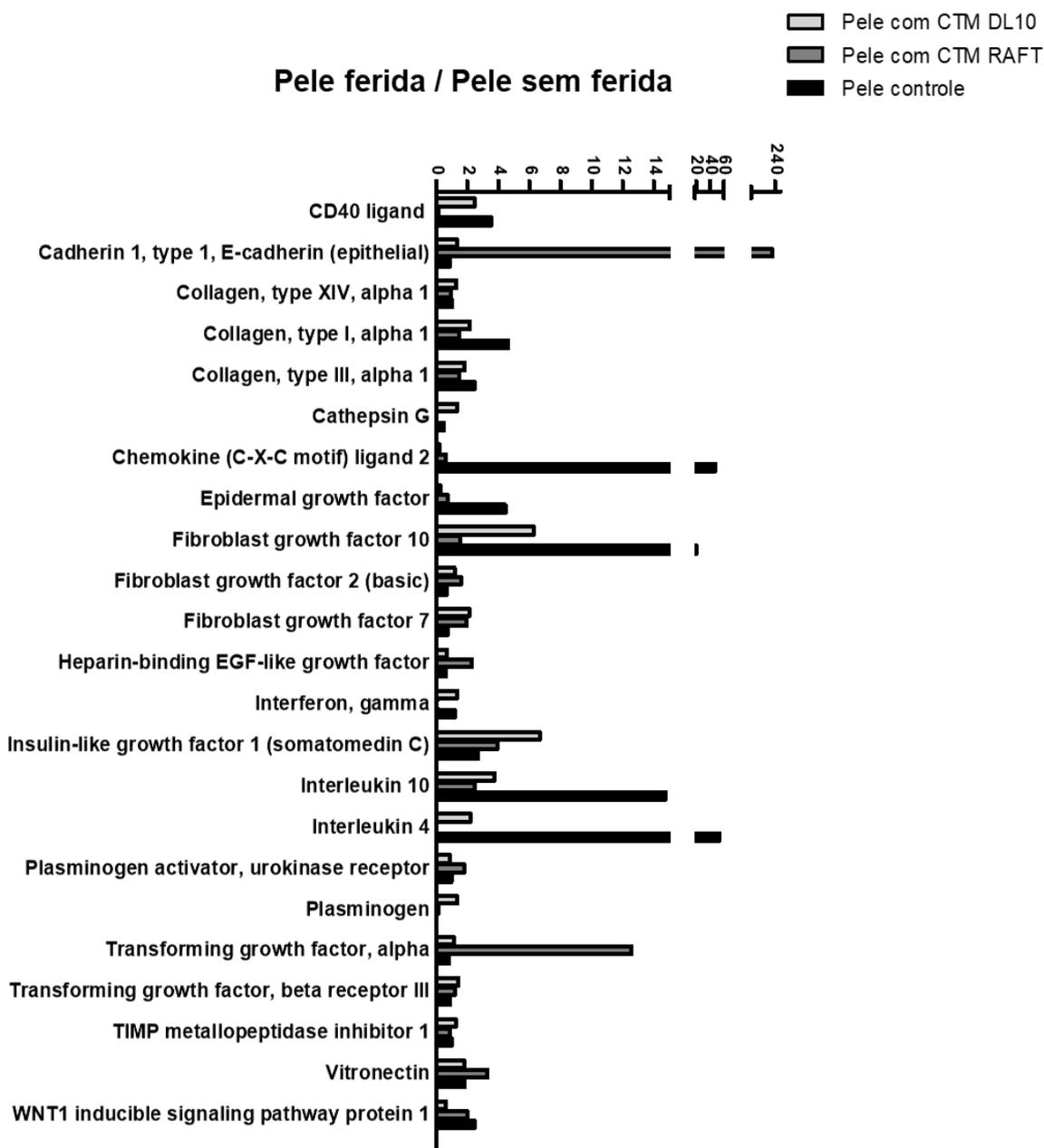


Fonte: do próprio autor.

Quando é avaliada a modulação de genes em peles feridas em relação às não feridas, observa-se alterações em diversos genes envolvidos na cicatrização, sendo que, na **Figura 41** são listados 23 deles. Quando os equivalentes epidérmicos foram compostos por CTM induzidas à diferenciação (RAFT), verificou-se uma maior expressão para o gene que codifica a proteína caderina 1, assim como o fator de

crescimento tumoral e a vitronectina. Observa-se alteração também nos genes IGF-1 e FGF-10, porém em menor intensidade. Na pele controle ferida, a proteína quimiocina CXC, sofreram alteração, quando comparadas às não feridas e, assim como nas CTM em DL10, o gene que codifica para FGF-10 também foi modulado.

Figura 41 - Genes modulados no processo cicatrização quando as peles contendo CTM ou queratinócitos são feridas.



Fonte: do próprio autor.

4.6 Caracterização de *scaffolds* como suporte dérmico

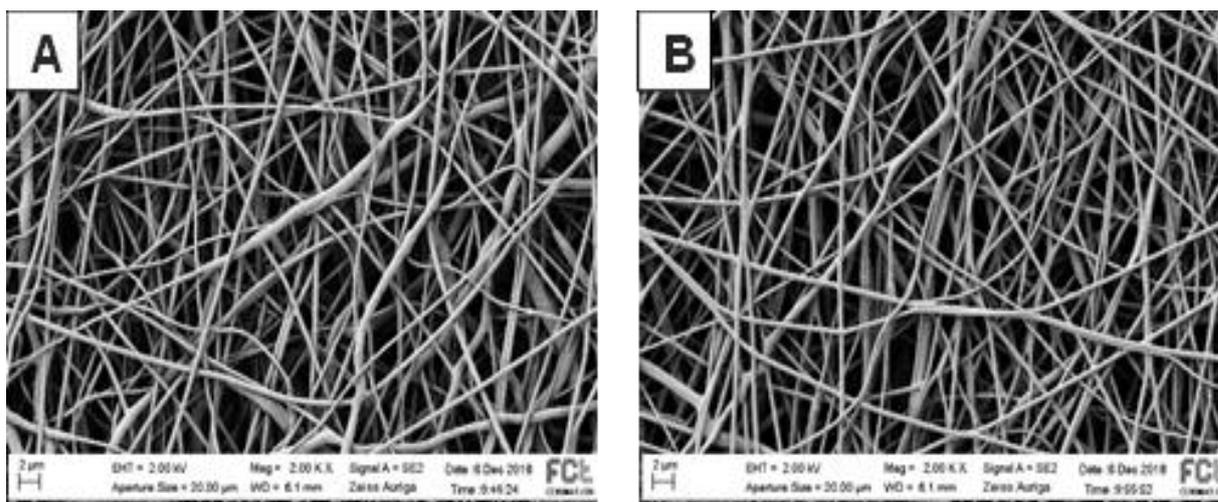
Os *scaffolds* produzidos foram caracterizados quanto a sua morfologia, citotoxicidade e permissividade para adesão celular.

4.6.1 Morfologia das fibras produzidas por eletrofiação

Referente à caracterização da morfologia do biomaterial produzido, as imagens de MEV mostraram que a formulação PCL/gelatina utilizada foi viável para eletrofiação, produzindo fibras uniformes e de disposição aleatória (**Figura 42**).

Com relação ao efeito do processo de reticulação de vapor de GTA na morfologia da nanofibra, utilizado para oferecer maior estabilidade à gelatina em cultura (GOMES et al., 2013; ORYAN et al., 2018), pode-se deduzir que este tratamento não alterou, significativamente, esse parâmetro. O diâmetro da fibra sofreu pequena variação de $0,398 \mu\text{m} \pm 0,08$, antes da reticulação, para $0,459 \mu\text{m} \pm 0,06$, após o processo, o que não foi relevante em termos das características finais da nanofibra.

Figura 42 - Imagens de MEV das fibras de PCL/gelatina produzidas pelo processo de electrospinning. Morfologia das fibras antes (A) e após (B) o processo de reticulação com vapor de GTA 5%.

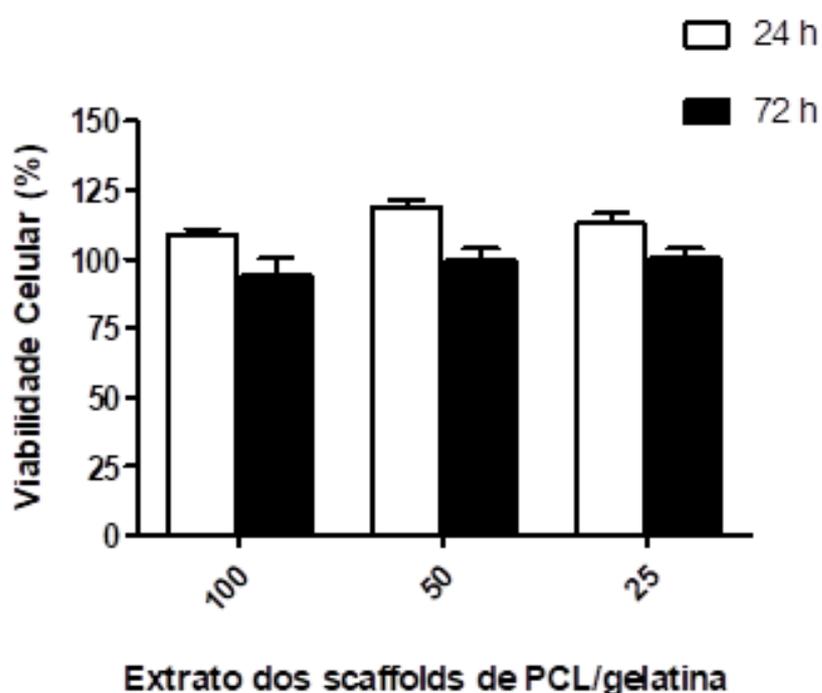


Fonte: do próprio autor.

4.6.2 Análise da Citotoxicidade

Os extratos não foram tóxicos para as células, que apresentaram viabilidade maior que 90%, mesmo após 3 dias de incubação com as mesmas, sugerindo que a composição proposta poderia ser usada em abordagens onde se pretende o contato direto das células com o material (**Figura 43**).

Figura 43 - Viabilidade após exposição das células com os extratos de PCL/gelatina. Células HFFF2 foram incubadas com o extrato dos *scaffolds*, em diferentes concentrações (100, 50 e 25%), por 24 e 72 h. Os dados estão expressos em termos da média \pm EP (n = 3).

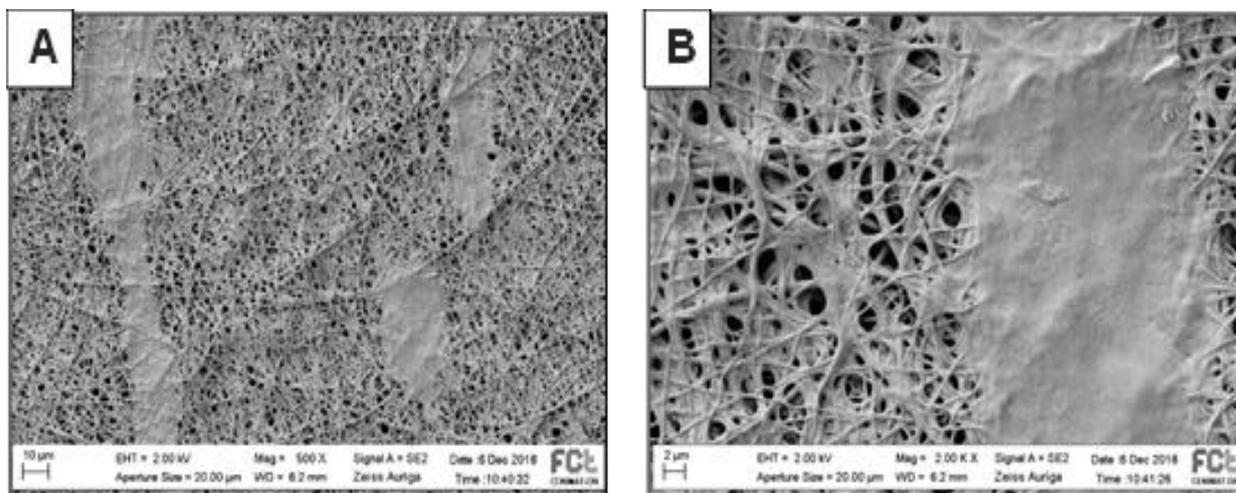


Fonte: do próprio autor.

4.6.3 Análises por Microscopia de Varredura nos Scaffolds

Na **Figura 44** observam-se extensões eletrodensas sobre as nanofibras dos *scaffolds*, o que caracteriza a presença de células sobre o biomaterial (QUERIDO, 2019). Aspectos da morfologia celular não foram evidenciados por esse método (**Figura 47**).

Figura 44 - Imagens de MEV dos *scaffolds* com as células. Fibroblastos dérmicos HFFF2 cultivados sobre *scaffolds* de PCL/gelatina por 3 dias, identificados por projeções eletrodensas sobre as nanofibras (setas brancas). Aumento de 500 x (A) e 2000 x (B).



Fonte: do próprio autor.

5. DISCUSSÃO

O uso de CTM do cordão umbilical configura-se como uma possibilidade interessante para as terapias celulares, devido ao seu potencial de autorrenovação e transdiferenciação. Além disso, por serem pouco imunorreativas e apresentarem capacidade imunomoduladora, há a perspectiva de serem empregadas na medicina regenerativa (ERICES; CONGET; MINGUELL et al., 2000; PHAM; VU, 2020).

Considerando-se essas vantagens, aliadas à observação de que o cordão umbilical é rico em CTM, no presente trabalho, estudamos, inicialmente, o potencial de transdiferenciação dessas células em uma epiderme estratificada, em modelos 3D de pele *in vitro*, utilizando diferentes equivalentes dérmicos, com perspectivas de uso na engenharia tecidual.

A caracterização das células provenientes do banco de células do Laboratório de Fisiologia da pele e Bioengenharia tecidual como CTM foi feita seguindo-se critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular – SITC (DOMINICI et al., 2006), entre os quais: a aderência à superfícies plásticas (WUCHTER; WAGNER; HO, 2011), formato fibroblastoide, a capacidade de diferenciação em tecidos de origem mesenquimal, *in vitro*, como os tecidos adipogênico, condrogênico e osteogênico, além da expressão de marcadores de superfície específicos tais como CD90, CD73 e CD105, mas não CD45 e CD34 (DOMINICI et al., 2006).

Em relação à expressão desses marcadores, os resultados de citometria evidenciaram que mais de 95% das células apresentaram os antígenos de superfície CD105, CD73, CD29, CD44, CD90, não havendo marcação significativa para os antígenos CD31 e CD34. O resultado obtido indica que a população selecionada expressa os marcadores encontrados em CTM, conforme já foi demonstrado por vários autores (DOMINICI et al., 2006, BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; WILLIAMS; HARE, 2011; MIYAKI et al., 2012, SANTOS et al., 2019; WUCHTER, WAGNER, HO, 2011; NAGAMURA-INOUE; HE, 2017).

Dos antígenos de superfície marcados positivamente, o CD105 ainda pode ter sua expressão variada dependendo da fonte celular (medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical, placenta, entre outros), do tempo de cultura *in vitro* e do estágio de diferenciação (KERN et al., 2006; JIN et al., 2009; JIANG et al., 2010). E, além de estar relacionado à caracterização das células como CTM, Pham et al. (2019) observaram que CTM do cordão umbilical negativas para CD105 liberam altas

concentrações de TGF- β no sobrenadante, sugerindo ser uma fonte adequada para o tratamento de doenças inflamatórias por sua capacidade imunomoduladora.

Os resultados de citometria mostraram que as CTM não expressaram CD34, uma glicofosfoproteína de superfície expressa no início do desenvolvimento de células células-tronco hematopoiéticas que poderiam estar presentes após o processo de isolamento. O resultado demonstrou que o processo de isolamento das células do cordão foi eficaz, não havendo co-purificação de células-tronco hematopoiéticas (KRAUSE et al., 1996; RATAJCZAK, 2008; WEISSMAN; SHIZURU, 2008).

Além do CD34, as CTM não foram, significativamente, marcadas pelo anticorpo que reconhece o antígeno CD31, também conhecido como PECAM-1. Essa glicoproteína transmembrana possui 130 kDa, é expressa em células endoteliais e leucócitos e está relacionada à adesão, migração e junção intercelular (MULLER et al., 1993; MÜLLER et al., 2002). Os dados obtidos confirmam o fato das células isoladas não serem endoteliais do vaso sanguíneo do cordão, evidenciando a eficiência no isolamento, e ratificando sua caracterização como CTM.

Diversos estudos têm caracterizado as CTM a partir da expressão de um conjunto menor de antígenos de superfície do que os utilizados nesse trabalho (SASAKI et al., 2008; JADALANNAGARI et al., 2016). Outros estudos sugerem a utilização de marcadores complementares para caracterização de CTM, como Stro-1, CD271, antígeno estágio-específico embrionário 4 (SSEA-4) e CD146 (SARUGASER et al., 2005, MARTIN-RENDON et al., 2008; LV et al., 2014).

Contudo, há quem considere que os marcadores positivos para CTM não são exclusivos dessas células. Wetzig et al. (2013), por exemplo, observaram que células do tecido olfatório, não consideradas CTM, expressam os marcadores CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105. Além disso, o mesmo propõe o uso de CD24, CD108 e CD40 como marcadores específicos de CTM.

Essas observações sugerem que somente a imunofenotipagem com os marcadores propostos pela SITC (DOMINICI et al., 2006) não deve ser considerada suficiente para caracterizar CTM. No entanto, aliando-se os resultados de imunofenotipagem à capacidade de diferenciação dessas células em distintos tipos celulares da linhagem mesenquimal (osteócitos, adipócitos e condrócitos) *in vitro*, reúnem-se elementos mais conclusivos na caracterização das CTM (DOMINICI et al., 2006).

Para indução da diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas na presença de IBMX - um inibidor da fosfodiesterase, indometacina e insulina, conforme Santos et al. (2019), Secco et al. (2007), Karahuseyinoglu et al. (2008) e Wang et al. (2012), sendo a diferenciação verificada por meio de acúmulo de lipídios no interior de vacúolos citoplasmáticos.

Os resultados mostraram que as CTM induzidas à diferenciação adipogênica apresentaram vacúolos lipídicos citoplasmáticos, o que evidencia o processo de diferenciação adipogênica tardia nas mesmas (SCHILLING et al., 2007). Em um estudo realizado por Sibov et al. (2012), a diferenciação adipogênica das CTM está relacionada à regulação de genes da via de sinalização do TGF- β , que é capaz de inibir a adipogênese por meio da sinalização de Smad3. Quando há o bloqueio dessa via há um aumento da quantidade de células progenitoras da adipogênese (NG et al., 2008).

Já o cultivo das células na presença de dexametasona e ácido ascórbico, que aumentam a mineralização de osteoblastos e inibem a apoptose, e β -glicerofosfato, que acelera a calcificação, além de ser um inibidor da fosfatase, promoveu a diferenciação das CTM em osteoblastos, que foi avaliada pela presença de cristais de fosfato de cálcio na matriz extracelular (HATTORI et al., 2006; SECCO et al., 2007, SANTOS et al., 2019).

A diferenciação condrogênica ocorreu quando as células foram cultivadas na presença de dexametasona, ácido ascórbico e de um suplemento contendo insulina, transferrina e ácido selênico, capazes de estimular tanto a proliferação quanto a diferenciação, verificada por meio da presença de glicosaminoglicanos na matriz extracelular, conforme já reportado por Secco et al. (2007).

Esses resultados, em conjunto, indicam que as células isoladas do cordão apresentam potencial de diferenciação em, pelo menos, três tipos celulares distintos, o que sugere que as mesmas sejam CTM, segundo os critérios da SITC.

Apesar disso, mesmo seguindo-se as normas da SICT, sabe-se que essas características são também identificadas em fibroblastos. Soundararajan e Kannan (2018) consideram que a capacidade proliferativa encontrada em CTM, na verdade, corresponde a fibroblastos imaturos, concluindo que as CTM não existem e que, na verdade, são células progenitoras encontradas em todo o organismo. Schellenberg et al. (2014), por sua vez, observaram que há diferenças epigenéticas no envelhecimento desses dois tipos celulares, indicando que o padrão de metilação pode ser a chave

para identificar as diferenças entre eles, fato também analisado por Almeida et al. (2016), que identificaram quatro ilhas CpG diferentes entre CTM e fibroblastos.

Após a caracterização das CTM, foram iniciados os experimentos para avaliar o seu potencial de transdiferenciação epidérmica em modelo de pele 3D, utilizando distintos equivalentes dérmicos. As características estruturais e químicas desses equivalentes são fundamentais para que a epiderme estratifique e diferencie completamente. Na pele humana, por exemplo, as fibras colágenas presentes na derme são importantes para manter as propriedades biomecânicas do tecido e os fatores de crescimento liberados pelos fibroblastos dérmicos podem induzir a estratificação fisiológica dos queratinócitos na epiderme (MARTIN PIEDRA et al., 2019).

O primeiro equivalente dérmico utilizado tratou-se de um *plug* de colágeno do tipo I associado a fibroblastos dérmicos humanos. Modelos de pele organotípicas *in vitro* utilizam essa estrutura dérmica, juntamente com queratinócitos basais induzidos à diferenciação epidermal, para a produção da chamada pele reconstruída 3D, utilizada em diferentes aplicações, incluindo a substituição à experimentação animal para testes toxicológicos (BROHEM et al., 2011; BELLAS et al., 2012; RANDALL et al., 2018, CATARINO et al., 2018).

Esse experimento é considerado a prova de conceito para o processo de diferenciação epidérmica das CTM, uma vez que já está bem estabelecido na pesquisa como modelo de pele 3D *in vitro* (ROGER et al., 2019). No entanto, cabe ressaltar que nem todos os queratinócitos primários são capazes de se diferenciar e estratificar *in vitro*, podendo resultar em imprevisibilidade dos resultados (EVES et al., 2000; ROGER et al., 2019). Além disso, esse modelo não é aplicável na clínica, por utilizar células somáticas que podem causar rejeição imunológica ao paciente. Também, o uso de linhagens celulares epidérmicas, como as HaCaT, não tem se mostrado viável para o desenvolvimento de um modelo de epiderme com morfologia organizada, além de ter uma capacidade limitada para sintetizar lipídios necessários para a formação de barreira (SCHOOP; MIRANCEA; FUSENIG, 1999; BOELSMA; VERHOEVEN; PONEC, 1999). Sendo assim, aliando as potencialidades da CTM em se transdiferenciar em queratinócitos (SANTOS et al., 2019) e sua aplicabilidade na medicina regenerativa, considera-se que um modelo de epiderme a partir de CTM poderia ser interessante e viável para utilização clínica.

A epiderme reconstruída a partir de queratinócitos basais sobre o *plug* de colágeno com fibroblastos apresentou organização estrutural típica, sendo possível observar a presença de todas as camadas da epiderme. Já a potencial epiderme formada a partir de CTM apresentou, de maneira geral, características de tecido conjuntivo frouxo. Apesar desse resultado indicar a formação de uma estrutura tridimensional epidérmica típica, ficou evidente a possibilidade da formação de um tecido conjuntivo pelas CTM, o que é reforçado pelo fato de que os fibroblastos, principais células desse tecido, também são de origem mesenquimal (CHANG; LI; GUO, 2014).

Tais características foram também observadas quando as CTM foram cultivadas sobre a matriz descelularizada porcina MatriXpec™. As matrizes descelularizadas são importantes candidatas a engenharia tecidual por preservarem a arquitetura e estrutura 3D da MEC (KUMAR et al., 2020). No entanto, seu processo de extração pode envolver métodos químicos, enzimáticos, físicos e/ou mecânicos que podem desestruturar proteínas chaves da MEC, como o colágeno, ou até mesmo a tornar citotóxica. Quando extraída de fonte de mamíferos, essas matrizes podem estar contaminadas com microorganismos que desencadeiam doenças zoonóticas (KAMALVAND et al., 2021), sendo esse um dos gargalos para seu uso na medicina regenerativa.

Outros estudos envolvendo CTM, inclusive as do cordão umbilical (SCHNEIDER et al., 2010), quando induzidas à diferenciação epidermal sobre matrizes dérmicas descelularizadas, apresentaram perfil migratório vertical quando expostas à IAL, e horizontal quando imersas completamente (SCHNEIDER et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2010). Os autores sugerem que a expressão de vimentina nas CTM do cordão umbilical possa contribuir para a organização dos tecidos e no processo de cicatrização, por remodelação da MEC, mas não, exatamente, por diferenciação em queratinócitos (SCHNEIDER et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2010, MARTIN-PIEDRA et al., 2019).

Além do aspecto de tecido conjuntivo frouxo da potencial epiderme formada a partir de CTM, foram encontrados vacúolos, possivelmente lipídicos, que sugerem a presença de adipócitos no local. Sabe-se que, tanto as CTM quanto os fibroblastos da tela subcutânea, possuem a capacidade de se diferenciar em adipócitos na pele (DRISKELL et al., 2013), o que explicaria a presença desses vacúolos. Os adipócitos, além de estarem relacionados a fonte e armazenamento de energia, também

funcionam como células endócrinas que secretam fatores de crescimento e citocinas na pele, estando associados a vários processos fisiológicos, como a cicatrização e estratificação da epiderme (SCHMIDT; HORSLEY, 2013).

Ainda, foi possível observar diferença no comportamento migratório das CTM de acordo com o meio de diferenciação utilizado. O principal componente, cujas concentrações variou, significativamente, nos meios foi o EGF (0,13 a 7,5 ng/ml). Sabe-se que esse fator exerce suas funções ao ligar-se no receptor do fator de crescimento epidérmico (REGF) e sua ação promove a diferenciação e migração dos queratinócitos por proliferação, além da formação de tecido de granulação, eventos importantes para a cicatrização de feridas (ODA et al., 2005; LI et al., 2021).

Nesse trabalho, foi observado que, quando utilizado equivalente dérmico de colágeno e fibroblastos, quanto maior a concentração de EGF no meio, maior o comportamento proliferativo/migratório das células em direção ao equivalente dérmico, o que corrobora os resultados de Schneider et al. (2010). Tais autores, ao usarem EGF 20 ng/ml por 21 dias para induzir a diferenciação epidermal, verificaram contração progressiva do colágeno e formação de um aglomerado de CTM em seu interior.

Contudo, não podemos afirmar se esse efeito foi causado somente pelo EGF nas concentrações empregadas, uma vez que as CTM cultivadas sobre matriz descelularizada em DL10, também apresentaram exacerbada proliferação em direção a esse equivalente dérmico. Resultados semelhantes foram encontrados por Kao (2021), ao cultivar CTM do cordão umbilical humano sobre um *bioscaffold* composto por gel de plasma rico em plaquetas, em DL10 e exposição à IAL. Nesse estudo, além das células proliferarem e migrarem em direção ao *bioscaffold*, as CTM passaram a expressar pan-citoqueratina e o marcador nuclear p63, evidenciando que a composição do suporte no qual as CTM estão aderidas pode ser decisivo no fenótipo que essas células irão adquirir ao longo do cultivo.

Outro parâmetro avaliado na transdiferenciação 3D, foi o tempo de exposição das CTM aos fatores químicos presentes nos meios. Ao serem cultivadas por 1 dia em meio de diferenciação, antes de serem expostas à IAL, as análises histológicas evidenciaram a formação de um tecido conjuntivo frouxo por essas células. No entanto, Chavez-Munoz et al. (2013) mostraram a expressão de marcadores específicos da diferenciação epidermal (como CQ5, CQ10 e involucrina) após a transdiferenciação de CTM de tecido adiposo em epiderme 3D, cultivando-as durante

10 dias em meio de queratinócitos e depois induzindo a estratificação epidérmica por 10 dias em IAL.

Apesar do aumento do período de cultivo em imersão das CTM, de 1 para 10 dias, e posterior exposição à IAL, as características morfológicas teciduais também apontaram a formação de tecido conjuntivo frouxo. Portanto, o período de imersão não foi decisivo para induzir fenótipo epitelial nas CTM. Contudo, foi observada discreta expressão de CQ10 por imunofluorescência.

Com 1 dia de imersão em meio de diferenciação, proteínas presentes nos diferentes estratos epidérmicos, como CQ14, CQ10, involucrina e filagrina, tiveram sua expressão aumentada, quando analisadas por PCR em tempo real. Especificamente, esse aumento foi significativo no 7º dia de cultura em IAL para as 3 primeiras proteínas analisadas, e no 10º dia para filagrina em relação à pele com CTM em DL10 no 4º dia. Nosso grupo já demonstrou aumento da expressão desses marcadores quando essas células são cultivadas bidimensionalmente, sendo o 7º dia decisivo para a expressão de marcadores epidermais como CQ10 e involucrina (SANTOS et al., 2019).

Corroborando esses resultados, Martin-Piedra et al. (2019) analisaram a expressão de diferentes marcadores epidermais quando CTM derivadas de tecido adiposo, polpa dentária, cordão umbilical e medula óssea, foram diferenciadas em queratinócitos em culturas organotípicas *in vitro* e *in vivo*, em 21 dias de IAL. O cultivo das CTM do cordão e da medula óssea resultou em mais camadas epidérmicas comparadas às outras fontes celulares, além de discreta expressão de CQ10 e filagrina *in vitro*, evidenciando que o protocolo de transdiferenciação epidermal 3D das CTM, apesar de não induzir a mudança do fenótipo mesenquimal para epitelial, foi capaz de induzir, parcialmente, a diferenciação epidérmica *in vitro*, a qual se concretizou após transplante *in vivo*. Quanto maior foi o tempo de exposição em IAL, maior foi a expressão dessas proteínas. Nossos dados foram obtidos com 10 dias de IAL, e evidenciaram aumento da expressão das proteínas epidermais nas peles com CTM induzidas à diferenciação, apesar de não ser obtida estratificação típica, sendo que, o aumento do tempo de exposição à IAL é algo a se considerar nos estudos de diferenciação de CTM em epiderme.

Uma importante constatação do trabalho de Martin-Piedra et al. (2019), foi que as CTM do cordão umbilical não expressaram o antígeno leucocitário humano (HLA) classe 1 e 2 em cultura tanto *in vitro* quanto *in vivo*, diferentemente das CTM de

medula óssea. Em casos de polimorfismos nos genes do complexo HLA pode haver rejeição de células ou enxertos de tecidos em receptores alogênicos, o que afeta a segurança e eficiência das terapias celulares (KULUS, et al., 2021). Em se tratando de perspectivas de uso clínico dessas células, as CTM do cordão umbilical tornam-se preferenciais, uma vez que são pouco imunogênicas após indução epidermal.

Além de equivalentes dérmicos cultivados juntamente com fibroblastos, foram utilizados outros equivalentes como o *scaffold* CellFate® e a matriz Integra®, que não foram cultivados com essas células, sendo adicionados fatores químicos para mimetizar a ação dos fibroblastos nesses modelos. As vantagens de se utilizar tais equivalentes dérmicos comparando-os à utilização de colágeno ou matriz descelularizada, é que esses produtos são reprodutíveis lote-a-lote, o que minimiza possíveis interferências biológicas (BIOCELLTIS).

As CTM, quando cultivadas sobre o CellFate® em meio de proliferação, apresentaram características de tecido conjuntivo e foram capazes de contrair esse biomaterial em sua região periférica, o que abre perspectivas para sua utilização em abordagens que envolvam o processo cicatricial, principalmente em sua fase de remodelamento tecidual. Quando diferenciadas, a arquitetura tecidual encontrada remete a um padrão de diferenciação predominante em alguns tipos de tumor, como sarcoma de tecidos moles, no qual as células formam feixes multidirecionados, compactos ou frouxos, há substância intersticial abundante entre as células fusiformes, bem como áreas com predomínio de células com núcleo hipercromático (VAN VLIET et al., 2009), o que vale a investigação de qual possível fator químico, ou a combinação deles, que leva à essa resposta das CTM, ou ainda, se há algum marcador tumoral que possa ser usado para identificar essas células antes de seu possível uso na clínica.

Apesar desse resultado não permitir avaliar, ainda, se a função de barreira da pele poderia ser atingida com o uso de CTM para formação de uma estrutura tridimensional epidérmica, ficou evidente a possibilidade dessas células formarem um tecido conjuntivo (SCHNEIDER et al., 2010; CHANG; LI; GUO, 2014).

Na análise por imunofluorescência, foi verificado que as CTM cultivadas sobre o CellFate® não expressaram CQ10, mesmo quando induzidas à diferenciação. Contudo, a expressão de CQ10 por queratinócitos, quando cultivados e diferenciados sobre o CellFate® ou o controle transwell®, foi detectável, evidenciando que o suporte

e o meio utilizados são suficientes para a estratificação epidérmica quando as células já estão comprometidas com essa diferenciação.

Em relação à matriz Integra®, sabe-se que possui poros que variam de 70 a 200 µm, o que a torna viável para fornecer uma arquitetura adequada para a neoderme (YANNAS; BURKE, 1980). Os resultados mostraram que as CTM foram capazes de aderir e proliferar sobre e para o interior dessa matriz. Esses dados corroboram estudos que mostraram aumento da proliferação celular com o uso desse tipo de matriz, tanto *in vitro* como *in vivo* (OJEH; FRAME; NAVSARIA, 2001; HODGKINSON; BAYAT, 2016). Hodgkinson e Bayat (2016), por exemplo, observaram que a funcionalização dessa matriz com ácido hialurônico aumentou, ainda mais, a proliferação, viabilidade e migração de fibroblastos e queratinócitos *in vitro*, uma alternativa para acelerar o processo de fechamento de feridas da pele.

Também durante o doutorado, foi produzido um *scaffold*, passível de uso na engenharia tecidual, pelo processo de eletrofiação composto por PCL e gelatina de peixe de água fria, conforme Pires et al. (2019). Em comparação à outras técnicas, como nanolitografia, e automontagem, a eletrofiação tem a vantagem de possuir um custo relativamente baixo e rentável. As características das fibras depositadas no processo de eletrofiação podem ser controladas pela manipulação da composição da solução e dos parâmetros do processamento (LAW et al., 2017). As nanofibras obtidas nos *scaffolds* foram compatíveis às fibras de colágeno dérmicas, corroborando resultados de outros autores que investigaram sua potencial utilização na regeneração de feridas na pele (GAUTAM et al., 2014; POWELL; SUPP; BOYCE, 2008; LAW et al., 2017; PIRES et al., 2019; ADELI-SARDOU et al., 2019).

Para produção dos *scaffolds* foram utilizados dois polímeros, PCL e gelatina, sendo um sintético e o outro natural, respectivamente. O PCL é aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para uso em dispositivos médicos e sistema de transporte de fármacos (GOMES et al., 2013). No entanto, seu processo de bioabsorção é muito demorado, de modo que sua utilização clínica deve levar em conta o tamanho e estado em que se encontra a ferida (WOODRUFF; HUTMACHER, 2009; CUNHA, 2012). A gelatina de peixe possui os domínios RGD que são reconhecidos por favorecerem a adesão e proliferação celular, no entanto, sua taxa de degradabilidade é alta (CHIOU et al., 2008). O uso combinado desses dois polímeros é interessante para o uso na engenharia tecidual, uma vez que eles

permitiram a adesão e proliferação dos fibroblastos (DUAN e al., 2013; GOMES et al., 2017; RAMALINGAM et al., 2019; SANTOS et al., 2019; YAZDANPANA et al., 2022).

Além das análises histológicas, uma importante avaliação bioquímica realizada nesse trabalho foi a quantificação da atividade de enzimas envolvidas com o processo de descamação fisiológico da epiderme, e relacionadas ao processo de diferenciação terminal dos queratinócitos, as chamadas KLK.

Neste trabalho, a atividade dessas enzimas foi avaliada na hidrólise de substratos FRET específicos. Esses substratos são ferramentas úteis para o estudo de peptidases específicas, uma vez que permitem detectar quantidades de enzimas na ordem de nanomolar, além do monitoramento da reação de forma contínua, proporcionando um método rápido para a determinação da atividade enzimática (CARMONA; JULIANO; JULIANO, 2009; SANTOS et al., 2019).

Segundo Teixeira et al. (2011), os substratos FRET Abz-KLRSSKQ-EDDnp e Abz-KLYSSKQ-EDDnp têm sido descritos como substratos para KLK5 e KLK7, que são calicreínas com especificidade do tipo da tripsina e quimotripsina, respectivamente. Oliveira et al. (2013) também têm usado esse substrato para avaliar a atividade enzimática de KLK7. Já o Abz-AFRFSQ-EDDnp tem sido considerado um substrato adequado para se avaliar a atividade da KLK6, uma calicreína do tipo tripsina (JIANG et al., 2011). Nosso grupo já demonstrou a atividade dessas enzimas no processo de transdiferenciação de CTM em queratinócitos no modelo bidimensional, de modo que podem ser utilizadas no acompanhamento do processo temporal de diferenciação epidérmica (SANTOS et al., 2019).

Com relação ao modelo 3D, foram observadas diferenças significativas da atividade de KLK entre a epiderme controle e a derme, nos diversos tipos de equivalentes dérmicos utilizados, embora os valores não tenham variado, significativamente, com o tempo de exposição à IAL. Isso demonstra a seletividade dessa atividade em relação aos queratinócitos, não sendo, significativamente, detectadas nos fibroblastos presentes no equivalente dérmico.

Ao se avaliar a atividade das KLK na potencial epiderme formada a partir das CTM cultivadas em diferentes meios de diferenciação sobre os equivalentes dérmicos, observou-se que sua atividade foi similar à atividade da epiderme controle e, de modo geral, não houve diferença entre os meios de diferenciação utilizados. Além disso, a atividade das KLK foi cerca de 2 a 3 vezes maior quando as CTM são induzidas à diferenciação epidérmica, comparando com as CTM cultivadas em DL10, em todos os

equivalentes dérmicos utilizados, o que corrobora os dados obtidos durante a diferenciação bidimensional dessas células (SANTOS et al., 2019).

Assim, embora não sejam observadas características morfológicas de um tecido epidérmico, os dados de expressão proteica aliados ao aumento da atividade de KLK, indicam comprometimento das CTM com o processo de diferenciação epidérmica, e sugere que essas células possuem a maquinaria enzimática necessária para essa diferenciação, e que também ratifica essas células apresentarem quantidades de KLK similares à epiderme humana *in vitro*. Esse fato deve ser considerado pois, em caso de patologias, como psoríase (KOMATSU et al., 2005), dermatite atópica (GUO et al., 2020) e síndrome de Netherton (NAUROY; NYSTRÖM, 2019), essa atividade é maior em relação à epiderme saudável.

Além da análise da adesão e, indiretamente, da proliferação celular sobre a matriz Integra®, foi avaliada a atividade enzimática de KLK nas células induzidas à diferenciação sobre esse suporte dérmico. Foi verificado que as CTM induzidas à diferenciação epidérmica apresentaram atividade superior àquelas cultivadas em meio de proliferação (DL10). Esse resultado foi similar à atividade da epiderme controle, já descrita anteriormente, o que abre perspectivas para o uso do Integra® como suporte para a indução da estratificação epidérmica.

Em geral, apesar dos resultados não indicarem a formação de uma epiderme tipicamente estratificada a partir de CTM, foi verificada a expressão de várias proteínas marcadoras da diferenciação epidérmica, com expressão de marcadores suprabasais, como CQ10 e involucrina, no período intermediário de IAL, e marcador de diferenciação terminal, como filagrina, no final do período de exposição, conforme Santos et al. (2019).

Adicionalmente, sabe-se que os efeitos parácrinos dessas células têm sido associados à melhora na migração e proliferação de células da pele, além de promover a angiogênese em feridas (RUSTAD et al., 2012). Segundo Balbino et al. (2005), danos teciduais, seja de natureza física, química ou biológica, desencadeiam imediatamente uma série de eventos e sinais que levam à ativação de células nervosas, estromais, vasculares, e circulatórias, que induzem a migração de células das áreas adjacentes para que ocorra a fibroplasia (produção de colágeno por fibroblastos), deposição de proteínas da MEC, angiogênese, cicatrização e reepitelização da região.

Os resultados do PCR Array revelaram que as CTM expressam mais α -actina do que os queratinócitos, o que é intensificado quando essas células são induzidas à diferenciação epidermal. Tal proteína é capaz de modular a motilidade dos queratinócitos, fazendo com que haja migração direcionada para o local da lesão (RODRIGUES et al., 2019). Além disso, as CTM expressam colágeno tipo I, III e XIV, moléculas envolvidas no remodelamento tecidual e manutenção mecânica do tecido (BALBINO et al., 2005; HARSHA; BRUNDHA, 2017). Esses dados sugerem que as CTM estariam envolvidas na fase de remodelamento tecidual, quando inseridas no microambiente da pele.

Outra importante molécula que deve ser investigada durante a cicatrização na presença de CTM é o IGF-1. Esse potente estimulante mitogênico é responsável por aumentar a expressão de cadeias pró-alfa (I e III) do procolágeno em cultura de fibroblastos *in vitro* (BALBINO et al., 2005; YOUSSEF; ABOALOLA; HAN, 2017). Nesse sentido, CTM de medula óssea foram usadas em modelo de pé diabético em roedores e melhoraram a cicatrização das feridas, concomitantemente, ao aumento de fatores de crescimento locais, como IGF-1, MMP-2 e EGF (de MAYO et al., 2017)

Os dados mostraram que nas CTM, principalmente quando induzidas à diferenciação, o gene que codifica para IGF-1 foi mais expresso quando comparado aos queratinócitos em modelo de pele 3D, o que sugere que essas células possam participar de forma parácrina no processo cicatricial pelo aumento da produção de colágeno pelos fibroblastos.

A formação da ferida no modelo de pele com CTM fez com que houvesse alta expressão de caderina do tipo 1, em comparação ao experimento sem a ferida. Essa é uma das principais moléculas de adesão, e medeia a adesão célula-célula dependente de cálcio, levando à reorganização do citoesqueleto de actina (GOMES, 2013; KUWAHARA et al., 2001). O aumento da expressão de actina poderia estar, intimamente, relacionado ao aumento de caderina do tipo 1, de modo que mais estudos devem ser realizados para investigar a relação dessas duas proteínas no processo cicatricial.

Em geral, o modelo de ferida estabelecido com CTM nesse trabalho permitiu investigar proteínas de sinalização moduladas durante o processo de cicatrização. As amostras foram avaliadas somente em um período (6 dias após realização da ferida), mas genes envolvidos na fase inflamatória, como a cadeia alfa do fibrinogênio, na fase de proliferação, como o fator de crescimento de fibroblastos-10, e na fase de

remodelamento, como colágeno I e fator de crescimento tumoral- β 3, da cicatrização tiveram sua expressão alterada, o que mostra sobreposição das fases. Ainda, como os genes mais modulados entre as peles feridas e não feridas, como colágeno I e III, estão envolvidos com a fase de remodelamento tecidual (BALBINO et al., 2005), sugere-se que o período analisado remete à essa fase da cicatrização. No entanto, mais experimentos em diferentes tempos devem ser realizados a fim de se estabelecer uma relação temporal do processo cicatricial. Além disso, esse modelo possui a limitação da ausência de vascularização, etapa importante e inicial para a cascata da cicatrização.

Por fim, conclui-se que a associação dos substitutos dérmicos com CTM poderá promover regeneração dérmica mais eficiente, pelo fato das CTM expressarem marcadores que as compromete com a diferenciação epidermal, bem como a atividade de KLK fundamentais para garantir uma diferenciação homeostática na pele (FISCHER; MEYER-HOFFERT; 2013; SANTOS et al., 2019), o que abre perspectivas de uso desse modelo para substituição da enxertia e/ou aceleração do processo cicatricial.

A partir desses resultados, entendemos que os protocolos de diferenciação epidérmica 3D ainda precisam ser melhor otimizados e outros ensaios devem ser realizados a fim de entender e comprovar o potencial de transdiferenciação 3D das CTM em uma epiderme morfológica e funcionalmente similar à epiderme humana. No entanto, dados prévios relacionados a cicatrização de feridas com essas células aponta sua utilização na medicina regenerativa como importante modulador parácrino e de remodelamento tecidual.

6. CONCLUSÃO

As células usadas nesse projeto foram caracterizadas como CTM por meio da aderência ao plástico, imunofenotipagem e diferenciação em tipos celulares da linhagem mesenquimal.

O uso do suporte confeccionado com colágeno tipo I e fibroblastos dérmicos foi utilizado como prova de conceito do processo de transdiferenciação. Tanto o cultivo por 1 ou 10 dias em meio de diferenciação, e posterior exposição à IAL, resultou em uma distribuição celular similar a um tecido conjuntivo frouxo. Contudo, foi detectada a expressão de CQ10 por imunofluorescência e, das proteínas CQ14, involucrina e filagrina por PCR em tempo real, sugerindo comprometimento com a diferenciação epidérmica.

Quando as CTM foram induzidas à diferenciação sobre a matriz descelularizada, também se verificou aumento da expressão das proteínas CQ5, CQ10 e involucrina no final do período de exposição à IAL, além de atividade de KLK.

O cultivo das CTM sobre o *scaffold* CellFate® não resultou na expressão de CQ10, embora tenha sido identificado aumento da atividade das KLK.

A tela absorvível Integra® permitiu a adesão celular e a diferenciação das CTM cultivadas sobre esse suporte também resultou em alta atividade de KLK.

Tais resultados indicam comprometimento das CTM com o processo de diferenciação epidérmica.

O *scaffold* produzido a partir da eletrofiação dos polímeros PCL e gelatina de peixe foi biocompatível, permitiu a proliferação de fibroblastos, sendo um candidato à engenharia tecidual para cicatrização de feridas.

A análise dos genes expressos por CTM e queratinócitos em modelo de cicatrização de pele 3D, estabelecido nesse projeto, aponta a utilização das CTM na medicina regenerativa, além de indicar proteínas interessantes para serem estudadas no processo cicatricial com as CTM. O perfil de expressão sugere que as CTM estejam relacionadas à fase de remodelamento tecidual do processo cicatricial.

REFERÊNCIAS

- ADELI-SARDOU, M. et al. Controlled release of lawsone from polycaprolactone/gelatin electrospun nano fibers for skin tissue regeneration. **Int J Biol Macromol.**, v. 124, p. 478-491, 2019.
- ALMEIDA D. C. et al. Epigenetic Classification of Human Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cell Reports**, v. 6, n. 2, p. 168-175, fev. 2016.
- ANGELO, P. F. et al. Substrate specificity of human kallikrein 6: salt and glycosaminoglycan activation effects. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 6, p. 3116-3126, 2006.
- ARNO, A. et al. Stem Cell Therapy: A New Treatment for Burns? **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 4, n. 10, p. 1355-1380, 2011. Review.
- BALBINO, C. A. et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** [online]. v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BALLESTEROS-CILLERO, R. et al. Biomimetic In Vitro Model of Cell Infiltration into Skin Scaffolds for Pre-Screening and Testing of Biomaterial-Based Therapies. **Cells**, v. 8, n. 8, p. E917, 2019.
- BELLAS, E. et al. In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials. **Macromol Biosci.**, v. 12, n. 12, p. 1627-1636, 2012.
- BIOCELLTIS. **Linha CellFate®**. Disponível em: <<https://www.biocelltis.com/cellfate>>. Acesso em: 24 jan 2022.
- BISHAI, I. E. M. et al. Mesenchymal stem cell separation from Wharton's jelly and its differentiation into keratinocytes. **Comp Clin Pathol**, v. 22, p. 547, 2013.
- BOELSMA, E.; VERHOEVEN, M. C.; PONEC, M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). **J Invest Dermatol**, v. 112, n. 4, p. 489-498, abr. 1999.
- BOYCE, S. T. et al. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. **Ann Surg**, v. 235, n. 2, p. 269-279, 2002.
- BRATTSAND, M. et al. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 1, p. 198-203, 2005.
- BRITO, T. S. Tratamento de queimados graves com transplante de pele homóloga: revisão sistemática. Monografia (conclusão do curso de medicina da Faculdade de Medicina da Bahia). Brasil, Bahia.p. 47, 2016.
- BROHEM, C. A. et al. Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24 n. 1, p. 35-50, 2011.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. Rev. **Bras. Hematol. Hemoter**, v. 31 p. 25-35, 2009. Supplement 1.

CALOMENO, L. H. et al. **Relato do primeiro ano de experiência do banco de pele do hospital Universitário Evangélico de Curitiba**. Resumo Expandido. Associação Médica Brasileira, Arquivos Catarinenses de Medicina. 44. ISSN:1806-4280. 2015. Suplemento 1.

CANDI, E. et al. Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. **J Invest Dermatol**, v. 119, n. 3, p. 670-677, 2002.

CARDILI, R. N. et al. Dermatite atópica e filagrina: restaurando barreiras para o controle da doença. **Braz J Allergy Immunol**, v. 1, n. 5, p. 239-242, 2013.

CARLSON, M. W. et al. (2008). Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. **Curr Protoc Cell Biol**; Chapter 19:Unit 19.9.

CARMONA, A. K.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 81, n. 3, p. 381-392, 2009.

CATARINO, C. M. et al. Skin corrosion test: a comparison between reconstructed human epidermis and full thickness skin models. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 125, p. 51-57, Apr 2018.

CAUBET, C. J. et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family. SCTE / KLK5 / hK5 and SCCE / KLK7 / hK7. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 5, p. 1235-1244, 2004.

CHANG, Y.; LI, H.; GUO, Z. Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, v. 34, n. 3, p. 703-714, Aug 2018. doi:10.1159/000363035.

CHAVEZ-MUNOZ, C. et al. Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: engineering a stratified epidermis. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e80587, 2013.

CHEN, D. et al. Transdifferentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into epidermal-like cells by the mimicking skin microenvironment. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 14 n. 2, p. 136-145, 2015.

CHIOU, B. et al. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 3748-3753, 2008.

CHUA, A. W. et al. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. **Burns Trauma**, v. 19, n. 4, p. 3, 2016.

CITRON, I. et al. Assessing burn care in Brazil: an epidemiologic, cross-sectional, nationwide study. **Surgery**, v. 163, n. 5, p. 1165-1172, 2018.

COOLEN, N. A. et al. Culture of Keratinocytes for Transplantation without the Need of Feeder Layer Cells. **Cell Transplant**, v. 16, n. 6, p. 649-661, 2007.

CORRÊA, F. B. **Estudo prospectivo, randomizado e controlado comparando a contração tardia do enxerto de pele parcial entre três matrizes dérmicas no tratamento das sequelas de queimaduras**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. p. 127, 2018.

COULOMB, B.; LEBRETON, C.; DUBERTRET, L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. **J Invest Dermatol**, v. 92, n. 1, p.122-125, 1989.

CUNHA, T. F. **Aplicação do poli(ε-caprolactona) com estrutura estrelada para obtenção de microesferas biorreabsorvíveis**. São Paulo. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, Brasil.

DĄBROWSKA, M.; MIELCAREK, A.; NOWAK, I. (2018). Evaluation of sex-related changes in skin topography and structure using innovative skin testing equipment. **Skin Res Technol**, v. 24, n. 4, p. 614-620, Nov 2018.

DE MAYO, T. et al. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0177533, Jun 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DRISKELL, R. R. et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, v. 504, n. 7479, p. 277-281, 2013.

DUAN, H. et al. Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/ polycaprolactone membranes. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 2077-2084, June 2013. doi: 10.2147/IJN.S42384.

ECHEVARRÍA-GUANILO, M. E. et al. Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde no primeiro ano após a queimadura. **Escola Anna Nery**, v. 20, n. 1, p. 155-166, 2016.

ECKERT, R. L.; CRISH, J. F.; ROBINSON, N. A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. **Physiol Rev**, v. 77, n. 2, p. 397-424, 1997.

EGLES, C.; GARLICK, J. A.; SHAMIS, Y. Three-dimensional human tissue models of wounded skin. **Methods Mol Biol.**, v. 585, p. 345-359, 2010. doi:10.1007/978-1-60761-380-0_24

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v. 109, p. 235-242, 2000.

EVES, P. et al. Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human skin. **Br J Dermatol**, v. 142, p. 210-222, 2000.

FERREIRA, M. C. et al. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Rev Bras Cir Plást**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.

FISCHER, J.; MEYER-HOFFERT, U. Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - from physiology to diseases to therapeutic options. **Thromb Haemost**, v. 110, n. 3, p. 442-449, 2013.

GAUTAM, S. et al. "Surface Modification of Nanofibrous Polycaprolactone/Gelatin Composite Scaffold by Collagen Type I Grafting for Skin Tissue Engineering." **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications** v. 34, p. 402-409, 2014.

GLUCKMAN, E.; ROCHA, V. Cord blood transplant: strategy of alternative donor search. **Springer Semin Immunopathol**, v. 26, n. 1-2, p. 143-154, July 2004. Review.

GOMES, S. R. R. **Desenvolvimento de matrizes biomiméticas como substitutos de pele destinados ao tratamento de queimaduras**. Dissertação de doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Portugal. p. 239, 2013.

GOMES, S. R. R. et al. Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering. **Int J Biol Macromol**, v. 102, p. 1174-1185, 2017.

GOMES, S. R. R. et al. In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 3, p. 1219-1227, 2013.

GUO, C. J. et al. Kallikrein 7 Promotes Atopic Dermatitis-Associated Itch Independently of Skin Inflammation. **J Invest Dermatol**, v. 140, n. 6, p. 1244-1252, 2020. doi:10.1016/j.jid.2019.10.022

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Adv Ther**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

Harsha L.; Brundha, M. Role of collagen in wound healing. **Drug Invent. Today**, v. 13, n. 1, p. 55-57, 2020.

HATTORI, H. et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 76, n. 1, p. 230-239, 2006.

HENG, B. C. et al. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. **ExpDermatol**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2005.

HODGKINSON, T.; BAYAT, A. A. In vitro and ex vivo analysis of hyaluronan supplementation of Integra® dermal template on human dermal fibroblasts and

keratinocytes. **J Appl Biomater Funct Mater**, v. 14, n. 1, p. 9-18, 2016. doi: 10.5301/jabfm.5000259.

HUANG, K. F. et al. Baicalein increases keratin 1 and 10 expression in HaCaT keratinocytes via TRPV4 receptor activation. **Exp Dermatol**, v. 25, n. 8, p. 623-629, 2016.

HULTMAN, C. S. et al. Allogeneic fibroblasts used to grow cultured epidermal autografts persist in vivo and sensitize the graft recipient for accelerated second-set rejection. **J Trauma**, v. 41, n. 1, p. 51-58, 1996. Discussion p. 8-60.

ILJAS, J. D. et al. A human skin equivalent burn model to study the effect of a nanocrystalline silver dressing on wound healing. **Burns**, v. 47, n. 2, p. 417-429, Mar 2021. doi: 10.1016/j.burns.2020.07.007.

ISHIDA-YAMAMOTO, A. et al. Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 5, p. 1137-1144, 2004.

JADALANNAGARI, S. et al. Potential mechanisms underlying ectodermal differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 478, n. 2, p. 831-837, 2016.

JEREMIAS, T. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89542, Feb 2014. doi:10.1371/journal.pone.0089542

JIANG, R. et al. Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. **J BiolChem**, v. 286, n. 11, p. 9127-9135, 2011.

JIN, H. J. et al. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 381, n. 4, p. 676-681, 2009.

KAMALVAND, M. et al. Design of a decellularized fish skin as a biological scaffold for skin tissue regeneration. **Tissue Cell**, v. 71, p. 101509, Aug 2021.

KAMOLZ, L. P. et al. Cultured human epithelium: human umbilical cord blood stem cells differentiate into keratinocytes under in vitro conditions. **Burns**, v. 32, n. 1, p. 16-19, 2006.

KAO, C. Application of Concentrated Growth Factors Membrane for Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell Differentiation towards Keratinocytes. *Separations*, v. 8, n. 61, p. 1-14, 2021.

KARAHUSEYINOGLU, S. et al. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 682-691, 2008.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KIM, K. et al. (2016). Mesenchymal Stromal Cells: Properties and Role in Management of Cutaneous Diseases. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. doi: 10.1111/jdv.13934. [Epub ahead of print].

KOMATSU, N. et al. Aberrant human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of patients with psoriasis: dependence on phenotype, severity and therapy. **Br J Dermatol**, v. 156, n. 5, p. 875-883, 2007.

KOMATSU, N. et al. Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender. **J Invest Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 1182-1189, 2005.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Mechanisms regulating epithelial stratification. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 93-113, 2007.

KRAUSE, D. S. et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 1-13, 1996.

Kulus, M. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human and Animal Perinatal Tissues-Origins, Characteristics, Signaling Pathways, and Clinical Trials. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3278, 2021. doi.org/10.3390/cells10123278

Kumar N, et al. Decellularization of Skin Tissue. **Adv Exp Med Biol**, v. 1345, p. 165-191, 2021.

Kuwahara M. et al.. E-cadherin expression in wound healing of mouse skin. **J Cutan Pathol**, v. 28, n. 4, p. 191-199, Apr 2001.

LAI, Y.; CHENG, K.; KISAALITA, W. Three dimensional neuronal cell cultures more accurately model voltage gated calcium channel functionality in freshly dissected nerve tissue. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45074, 2012.

LAMME, E. N. et al. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. **J Pathol**, v. 190, n. 5, p. 595-603, 2000.

LAW, J. X. et al. Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. **Tissue Eng Regen Med**, v. 14, n. 6, p. 699-718, Aug 2017. doi:10.1007/s13770-017-0075-9

LI, B. et al. Calcium silicate accelerates cutaneous wound healing with enhanced re-epithelialization through EGF/EGFR/ERK-mediated promotion of epidermal stem cell functions. **Burns Trauma**. 2021 Sep 30;9:tkab029.

LI, Z. et al. Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into keratinocyte-like cells in xeno-free conditioned medium. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 17, Mar 2015. doi: 10.1186/s13287-015-0008-2.

LIN, Y.; HOGAN, W. J. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment and Prevention of Graft-versus-Host Disease. **Adv Hematol**, v. 2011, p. 427863, 2011.

LIN, Y. H. et al. The effects of microenvironment on wound healing by keratinocytes derived from mesenchymal stem cells. **Ann Plast Surg**, v. 71, p. 67-74, 2013. Supplement 1.

LOURA, L. M.; PRIETO, M. FRET in Membrane biophysics: an overview. **Front Physiol**, v. 15, n. 2, p. 82, 2011.

LV, F. J. et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 32, n. 6, p. 1408-1419, Jun 2014.

MARTIN-PIEDRA, M. A. et al. Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. **Eur Cell Mater**, v. 37, p. 233-249, Mar 2019.

MARTIN-RENDON, E. et al. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. **Vox Sang**, v. 95, n. 2, p. 137-148, Aug 2008.

MASRI, S. et al. Cellular Interaction of Human Skin Cells towards Natural Bioink via 3D-Bioprinting Technologies for Chronic Wound: A Comprehensive Review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, p. 476, 2022. doi.org/10.3390/ijms23010476

MIDDELKOOP, E. et al. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1559-1567, 2004.

MIYAKI, L. A. M. et al. Study of internalization and viability of multimodal nanoparticles for labeling of human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Einstein**, v. 10, n. 2, p. 189-196, 2012.

MOHD HILMI, A. B.; HALIM, A. S. Vital roles of stem cells and biomaterials in skin tissue engineering. **World J. Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 428-436, 2015.

MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; DEL CARLO, R. J. Mesenchymal stem cell. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MORAES, D. What the relationship between CD90 e CD44 in Mesenchymal Stem Cells?. **Cytotherapy**, v. 20, p. 5, 2018. doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.02.124

MÜLLER, A. M. et al. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. **Exp Mol Pathol**, v. 72, n. 3, p. 221-229, 2002.

MULLER, W. A. et al. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. **J. Exp. Med**, v. 178, n. 2, p. 449-460, 1993.

NAGAMURA-INOUE, T.; HE, H. (2017). Umbilical cord-derived Mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World J Stem Cells**. 2014 Apr 26; v. 6, n. 2, p.195-202, Apr 2014.

NAUROY, P.; NYSTRÖM, A. Kallikreins: Essential epidermal messengers for regulation of the skin microenvironment during homeostasis, repair and disease. **Matrix Biol Plus**. 2019 Nov 21;6-7:100019. doi: 10.1016/j.mbplus.2019.100019.

NG, F. et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 295-307, 2008.

NOURIAN DEHKORDI, A. et al. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 111, 2019.

NUNES, V. A. (2009). Exploring the potential of adult stem cells: why umbilical cord blood? In; **Stem Cells: Basic and applications**. Kaushik D DandSatish MT (Ed), Editora McGraw Hill, pp 603-613.

NUNES, V. A. et al. Stem cells from umbilical cord blood differentiate into myotubes and express dystrophin in vitro only after exposure to in vivo muscle environment. **Biol Cell**, v. 99, n. 4, p. 185-196, 2007.

NUNES, V. A.; ZATZ, M. Doenças Genéticas: Como tratá-las? In: Células-tronco: A Nova fronteira da Medicina. Eds. Marco Antonio Zago e Dimas Tadeu Covas, São Paulo, **Atheneu**, v.1, p. 197-221, 2006.

_____. Os avanços da Biotecnologia nas Tentativas Terapêuticas de Doenças Genéticas. In: Inovação, Biotecnologia e Saúde Pública. Instituto UNIEMP. Fórum Permanente das Relações Universidade-Empresa. Eds. Regina Scivolletto e Antonio Carlos Camargo, São Paulo, v. 1, p. 31-60, 2005.

ODA, K. et al. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. **Mol Syst Biol**. 2005;1:2005.0010.

OJEH, N. O.; FRAME, J. D.; NAVSARIA, H. A. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. **Tissue Eng**, v. 7, n. 4, p. 457-472, 2001.

OLIVEIRA, J. P. et al. Isomannide-based peptidomimetics as inhibitors for human tissue kallikreins 5 and 7. **ACS Med Chem Lett**, v. 5, n. 2, p. 128-132, 2013.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **The Wound Healing Society**. Chronic wound care guidelines. 2018.

ORYAN, A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **Int J Biol Macromol**, v. 107, (Pt A), p. 678-688, 2018.

PAGANELLI, A. et al. In vitro Engineering of a Skin Substitute Based on Adipose-Derived Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, v. 207, n. 1, p. 46-57, 2019.

PHAM, C. et al. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. **Burns**, v. 33, n. 8, p. 946-957, 2007.

PHAM, P. V.; VU, N. B. Off-the-shelf mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue can significantly improve symptoms in COVID-19 patients: An analysis of evidential relations. **World J Stem Cells**, v. 12, n. 8, p. 721-730, Aug 2020.

PHILLIPS, C. J. et al. Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. **Int Wound J**, v. 13, n. 6, p. 1193-1197, Dec 2016.

PIRES, F. et al. Polycaprolactone/Gelatin Nanofiber Membranes Containing EGCG-Loaded Liposomes and Their Potential Use for Skin Regeneration. **ACS Appl Bio Mater**, v. 2, n. 11, p. 4790-4800, Nov 2019.

POLAKOWSKA, R.; HERTING, E.; GOLDSMITH, L. A. Isolation of cDNA for human epidermal type I transglutaminase. **J Invest Dermatol**, v. 96, n. 2, p. 285-288, 1991.

POWELL, H. M.; SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. **Biomaterials**, v. 29, p.834-843, 2008. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.036.

PRUNIERAS, M.; REGNIER, M.; WOODLEY, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. **J Invest Dermatol**, v. 81, p.28-33, 1983.

QUERIDO, D. S. F. **Análise da infiltração celular numa matriz de nanofibras com poros expandidos**. Dissertação de mestrado (Engenharia biomédica). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal. 115 p, 2019.

RAMALINGAM, R. et al. Poly- ϵ -Caprolactone/Gelatin Hybrid Electrospun Composite Nanofibrous Mats Containing Ultrasound Assisted Herbal Extract: Antimicrobial and Cell Proliferation Study. **Nanomaterials** (Basel), v. 9, n. 3, p. E462, 2019.

RANDALL, M. J. et al. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 6, p. 154, 2018. doi: 10.3389/fbioe.2018.00154. eCollection 2018. Review.

RATAJCZAK, M. Z. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. **Curr Opin Hematol**, v. 15, n. 4, p. 293-300, 2008.

RAWLINGS, A. V. et al. Stratum corneum moisturization at the molecular level. **J Invest Dermatol**, v. 103, n. 5, p. 731-741, 1994.

RICE, R. H.; GREEN, H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. **Cell**, v. 18, n. 3, p. 681-694, 1979.

RODRIGUES M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Rev**, v. 99, n. 1, p. 665-706, 2019. doi:10.1152/physrev.00067.2017

ROGER, M. et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. **J. Anat.**, v. 234, p. 438-455, 2019.

RUSTAD, K. C. et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. **Biomaterials**, v. 33, n. 1, p. 80-90, 2012.

SANTOS, J. F. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: Towards an in vitro model of human epidermis. **J Cell Biochem**, v. 120, n. 8, p. 13141-13155, 2019.

SARUGASER, R. et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**, v. 23, n. 2, p. 220-229, Feb 2005.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2581-2587, 2008.

SCHELLENBERG, A. et al. Matrix elasticity, replicative senescence and DNA methylation patterns of mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6351-6358, Aug 2014.

SCHILLING, T. et al. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 271, n. 1-2, p. 1-17, 2007.

SCHMIDT, B. A.; HORSLEY, V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. **Development**, v. 140, n. 7, p. 1517-1527, 2013. doi:10.1242/dev.087593.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHNEIDER, R. K. et al. Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. **Differentiation**, v. 79, n. 3, p. 182-193, 2010.

SCHNEIDER, R. K. et al. Three-dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblastic phenotype and function. **Differentiation**, v. 76, n. 2, p. 156-167, Feb 2008.

SCHOOP, V. M.; MIRANCEA, N.; FUSENIG, N. E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v. 112, n. 2, p. 343-353, Mar 1999. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x.

SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! **Stem Cell**, v. 26 p.146-150, 2007.

SHAHROKHI, S.; ARNO, A.; JESCHKE, M. G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase Wound Repair Regen, v. 22, n. 1, p. 14-22, 2014.

SIBOV, T. T. et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. **Cytotechnology**, v. 64, n. 5, p. 511-521, 2012.

SIMON, M. et al. Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 23, p. 20292–20299, 2001.

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res**, v. 58, n. 1-2, p. 81-94, 2017. doi:10.1159/000454919.

SOUNDARARAJAN, M.; KANNAN, S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? **J Cell Physiol**, v. 233, n. 12, p. 9099-9109, Dec 2018.

STEFANŃSKA, K. et al. Human Wharton's Jelly-Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 4, p. 1102, 2020. doi.org/10.3390/jcm9041102

STEFFENS, D. et al. Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute. **Regen Med**, v. 10, n. 8, p. 975-987, 2015.

TAM, K. et al. A nanoscaffold impregnated with human wharton's jelly stem cells or its secretions improves healing of wounds. **J Cell Biochem**, v. 115, n. 4, p. 794-803, 2014.

TEIXEIRA, T. S. et al. Biological evaluation and docking studies of natural isocoumarins as inhibitors for human kallikrein 5 and 7. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 20, p. 6112-6115, 2011.

TEZUKA, T.; TAKAHASHI, M.; KATSUNUMA, N. Cystatin alpha is one of the component proteins of keratohyalin granules. **J Dermatol**, v. 19, n. 11, p. 756-760, 1992.

TISSUELABS. MatriXpec™ Hydrogels. Disponível em: <<https://www.tissuelabs.com/matrixpec-hydrogels>>. Acesso em: 24 jan 2022.

TOAI, C. T. et al. In vitro culture of keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: the Saigonesse culture. **Cell Tissue Bank**, v. 12, n. 2, p. 125-133, 2011.

VAN VLIET, M. et al. Soft tissue sarcomas at a glance: clinical, histological, and MR imaging features of malignant extremity soft tissue tumors. **Eur Radiol**, v. 19, p. 1499-1511, 2009. doi.org/10.1007/s00330-008-1292-3

VAN ZUIJLEN, P. et al. Tissue engineering in burn scar reconstruction. **Burns Trauma**, v. 3, p. 18, 2015.

WANG, H. et al. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 14, n. 4, p. 423-430, 2012.

WANG, H. S. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1330-1337, 2004.

WANG, W. et al. IL-36 γ inhibits differentiation and induces inflammation of keratinocyte via Wnt signaling pathway in psoriasis. **Int J Med Sci**, v. 14, n. 10, p. 1002-1007. Aug 2017. doi:10.7150/ijms.20809

WASIAK, J. et al. Predictors of health status and health-related quality of life 12 months after severe burn. **Burns**, v. 40, n. 4, p. 568-574, 2014.

WEISSMAN, I. L.; SHIZURU, J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3543-3553, 2008.

WETZIG, A. et al. Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. **BMC Cell Biol**, v. 14, p. 54, 2013.

WILLIAMS, A. R.; HARE, J. M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. **Circ Res**, v. 109, n. 8, p. 923-940, 2011.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer : Polycaprolactone in the 21st century. **Prog Polym Sci**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2009. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

WRIGHT, A.; ARTHAUD-DAY, M. L.; WEISS, M. L. Therapeutic Use of Mesenchymal Stromal Cells: The Need for Inclusive Characterization Guidelines to Accommodate All Tissue Sources and Species. **Front. Cell Dev. Biol**, v. 9, p. 632717, 2021. doi:10.3389/fcell.2021.632717

WUCHTER, P.; WAGNER, W.; HO, A. D. Mesenchymal stem cells: an oversimplified nomenclature for extremely heterogeneous progenitors. **Regenerative Medicine**, v. 3, n. 3, p. 377-395, 2011.

XIE, S. Y. et al. Adult stem cells Seeded on electrospinning silk fibroin nanofibrous scaffold enhance wound repair and regeneration. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 16, n. 6, p. 5498-5505, 2016.

XIE, Y. et al. Development of a three-dimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 16, n. 5, p. 1111-1123, Oct 2010. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0725.

YANNAS, I. V.; BURKE, J. F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. **J Biomed Mater Res**, v. 14, p. 65-81, 1980.

YAZDANPANA, A. et al. Bioengineering of fibroblast-conditioned Polycaprolactone/Gelatin electrospun scaffold for skin tissue engineering. **Artif Organs**. 2022 Jan 10.

YI, S. et al. (2016). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Curr Stem Cell Res Ther**.2016 Sep 4.[Epub ahead of print].

YOUSSEF, A.; ABOALOLA, D.; HAN, V. K. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. **Stem Cells Int**, v. 2017, p. 9453108, 2017.

ZATZ, M.; NUNES, V. A. Terapia Celular: Esperança de tratamento para distrofias musculares? In: *Conduitas em Neurologia. Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da FMUSP*. Eds. Ricardo Nitrini, Getúlio Daré Rabello, Ida Fortini, Paulo Caramellie Marcelo Calderaro. São Paulo, v. 1, p. 47-61, 2005.

ZAULYANOV, L.; KIRSNER, R. S. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. **Clin Interv Aging**, v. 2, n. 1, p. 93-98, 2007.

APÊNDICE A – Artigo publicado pela aluna como primeira autora que contempla os resultados da tese

Received: 15 June 2018 | Revised: 20 December 2018 | Accepted: 7 January 2019
DOI: 10.1002/jcb.28589

RESEARCH ARTICLE

Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: Towards an in vitro model of human epidermis

Jeniffer Farias dos Santos^{1,2} | Nathália Ruder Borçari¹ | Mariana da Silva Araújo² | Viviane Abreu Nunes¹

¹School of Arts, Sciences and Humanities, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil

²Department of Biochemistry, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

Correspondence
Viviane Abreu Nunes, Av. Arlindo Bettio, 1000, Ermelino Matarazzo, Sao Paulo, SP 03828-000, Brazil.
Email: vanunes@ib.usp.br

Funding information
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2013/03503-3 and 2013/23245-9

Abstract

Epidermal differentiation is a complex process in which keratinocytes go through morphological and biochemical changes in approximately 15 to 30 days. Abnormal keratinocyte differentiation is involved in the pathophysiology of several skin diseases. In this scenario, mesenchymal stem cells (MSCs) emerge as a promising approach to study skin biology in both normal and pathological conditions. Herein, we have studied the differentiation of MSC from umbilical cord into keratinocytes. MSC were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (proliferation medium) and, after characterization, differentiation was induced by culturing cells in a defined keratinocyte serum-free medium (KSPM) supplemented with epidermal growth factor (EGF) and calcium chloride ions. Cells cultivated in DMEM were used as control. Cultures were evaluated from day 1 to 23, based on the cell morphology, the expression of p63, involucrin and cytokeratins (KRTs) KRT5, KRT10 and KRT14, by quantitative polymerase chain reaction, Western blot analysis or immunofluorescence, and by the detection of epidermal kallikreins activity. In cells grown in keratinocyte serum-free medium with EGF and 1.8 mM calcium, KRT5 and KRT14 expression was shown at the first day, followed by the expression of p63 at the seventh day. KRT10 expression was detected from day seventh while involucrin was observed after this period. Data showed higher kallikrein (KLK) activity in KSPM-cultured cells from day 11th in comparison to control. These data indicate that MSC differentiated into keratinocytes similarly to that occurs in the human epidermis. KLK activity detection appears to be a good methodology for the monitoring the differentiation of MSC into the keratinocyte lineage, providing useful tools for the better understanding of the skin biology.

KEYWORDS
differentiation, epidermal markers, keratinocytes, mesenchymal stem cells, tissue kallikreins

J Cell Biochem. 2019;120:13141-13155.
wileyonlinelibrary.com/journal/jcb
© 2019 Wiley Periodicals, Inc. | 13141

APÊNDICE B – Artigo publicado pela aluna que contempla os resultados obtidos durante doutorado sanduíche (primeira autoria compartilhada)

Downloaded via UNIV OF SAO PAULO on November 22, 2020 at 14:32:44 (UTC).
See <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.

ACS APPLIED

BIO MATERIALS

Article

www.acsami.org

Polycaprolactone/Gelatin Nanofiber Membranes Containing EGCG-Loaded Liposomes and Their Potential Use for Skin Regeneration

Filipa Pires,^{†,‡} Jeniffer Farias Santos,^{†,‡} Diogo Bitoque,[†] Gabriela Araújo Silva,[†] Alexandre Marletta,[§] Viviane Abreu Nunes,[‡] Paulo A. Ribeiro,[†] Jorge Carvalho Silva,^{*,||} and Maria Raposo^{*,†}

[†]CEFITEC, Physics Department, Faculty of Science and Technology, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516, Caparica, Portugal

[‡]EACH, School of Arts, Sciences and Humanities, Biotechnology Laboratory, Universidade de São Paulo, 03828-000, São Paulo, Brazil

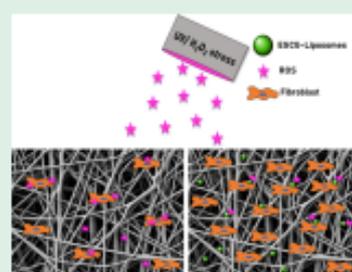
[§]CEDOC, NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Campo Mártires da Pátria 130, 1169-056 Lisboa, Portugal

^{||}Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^{*}CENIMAT/13N, Physics Department, Faculty of Science and Technology, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516, Caparica, Portugal

ABSTRACT: Polymeric scaffolds incorporating plant-derived compounds, produced by electrospinning, have attracted attention in the field of skin tissue engineering. This study evaluates the sustained antioxidant activity of polycaprolactone (PCL)/gelatin nanofibers prepared by electrospinning and incorporating loaded liposomes of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a strong antibacterial and antioxidant molecule found in green tea, that significantly accelerates the wound-healing process. The morphology and the structural properties of the membranes were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and FTIR spectroscopy. Results revealed that the EGCG released from PCL/gelatin nanofibers scavenges the toxic ROS species generated by exposure to either H₂O₂ or UV radiation and slows down the oxidation events associated with damage. This study provides the basis for development of promising nanofiber formulations containing EGCG that might enhance repair/regeneration of skin tissue.

KEYWORDS: EGCG, natural antioxidant, ultraviolet radiation, oxidative stress, electrospinning, scaffolds, skin regeneration



1. INTRODUCTION

Skin is a crucial organ of the human body that confers immunologic protection against pathogenic invasion and provides shielding against harmful physical and chemical agents such as exposure to ultraviolet radiation (UV), toxic metals, cigarette smoke, among others.^{1,2} These agents contribute to an excessive generation and accumulation of highly toxic reactive oxygen species (ROS), which have been associated with skin aging,^{3,4} cancer progression enhancement,^{5,6} and delay in the wound-healing process.⁷ Wound healing is a complex and highly dynamic process that requires a balance between ROS species production and detoxification, and involves multiple steps including inflammation, proliferation, and tissue remodeling. Remarkably, low levels of ROS are required to activate cell signaling pathways and angiogenesis that participate in the elimination of invading pathogens, whereas high ROS levels trigger oxidative stress that seriously compromises tissue repair, resulting in chronic nonhealing wounds that can be painful and require expensive and long-term treatments.^{8,9} Fortunately, the advances in the skin tissue engineering field allowed successful design of new

biomaterials and scaffolds that—after surface functionalization with specific biomolecules (growth factors,¹⁰ vitamins,¹¹ antibiotics¹²)—can prevent infection and promote quick revascularization and re-epithelialization, thus significantly improving wound healing. The biomaterials used should be biocompatible and biodegradable, and the scaffolds should be permeable to moisture and oxygen and able to absorb wound exudate, avoid infections and mechanical irritations and provide an architecture that sustains cell adhesion, infiltration, and proliferation.

One of the approaches used to produce scaffolds for skin tissue engineering is the electrospinning technique. This technique has been widely used for nanofiber scaffold production and is gaining more and more interest because the membranes obtained architecturally resemble the fibrillary structure of the extracellular matrix, thus enhancing cell attachment.^{13,14} Biocompatible scaffolds, with good mechan-

Received: June 14, 2019

Accepted: September 28, 2019

Published: September 28, 2019

APÊNDICE C – Lista dos genes analisados pelo RT² Profiler PCR Array – *Wound Healing*

Genes de cicatrização:

1. Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
2. Actin, alpha, cardiac muscle 1
3. Angiopoietin 1
4. Chemokine (C-C motif) ligand 2
5. Chemokine (C-C motif) ligand 7
6. CD40 ligand
7. Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
8. Collagen, type XIV, alpha 1
9. Collagen, type I, alpha 1
10. Collagen, type I, alpha 2
11. Collagen, type III, alpha 1
12. Collagen, type IV, alpha 1
13. Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
14. Collagen, type V, alpha 1
15. Collagen, type V, alpha 2
16. Collagen, type V, alpha 3
17. Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
18. Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
19. Connective tissue growth factor
20. Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
21. Cathepsin G
22. Cathepsin K
23. Cathepsin L2
24. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
25. Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
26. Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
27. Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
28. Epidermal growth factor
29. Epidermal growth factor receptor

30. Coagulation factor XIII, A1 polypeptide
31. Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)
32. Fibrinogen alpha chain
33. Fibroblast growth factor 10
34. Fibroblast growth factor 2 (basic)
35. Fibroblast growth factor 7
36. Heparin-binding EGF-like growth factor
37. Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
38. Interferon, gamma
39. Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
40. Interleukin 10
41. Interleukin 1, beta
42. Interleukin 2
43. Interleukin 4
44. Interleukin 6 (interferon, beta 2)
45. Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
46. Integrin, alpha 1
47. Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
48. Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
49. Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
50. Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
51. Integrin, alpha 6
52. Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
53. Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
54. Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
55. Integrin, beta 5
56. Integrin, beta 6
57. Mitogen-activated protein kinase 1
58. Mitogen-activated protein kinase 3
59. Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
60. Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
61. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)

62. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
63. Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
64. Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
65. Plasminogen activator, tissue
66. Plasminogen activator, urokinase
67. Plasminogen activator, urokinase receptor
68. Plasminogen
69. Phosphatase and tensin homolog
70. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
71. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
72. Ras homolog gene family, member A
73. Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
74. Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
75. Transgelin
76. Transforming growth factor, alpha
77. Transforming growth factor, beta 1
78. Transforming growth factor, beta receptor III
79. TIMP metalloproteinase inhibitor 1
80. Tumor necrosis factor
81. Vascular endothelial growth factor A
82. Vitronectin
83. WNT1 inducible signaling pathway protein 1
84. Wingless-type MMTV integration site family, member 5A

Constitutivos

85. Actin, beta
86. Beta-2-microglobulin
87. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
88. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

89. Ribosomal protein, large, P0

Controles:

90. Human Genomic DNA Contamination

91. Reverse Transcription Control

92. Positive PCR Control

APÊNDICE D – Produção científica obtida durante o projeto de doutorado

- **Artigos Publicados como primeira autora:**

1. Santos, JF; Borçari, NR; Araújo, MS; Nunes, VA. Mesenchymal stem cells from umbilical cord differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: towards an in vitro model of human epidermis. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.1, p.jcb.28589, 2019.
2. Pires, F*; Santos, JF*; Bitoque, D; Silva, GA; Marletta, A; Nunes, V; Ribeiro, PA; Silva, JC; Raposo, M. Polycaprolactone/gelatin nanofiber membranes containing EGCG loaded liposomes and their potential use for skin regeneration. *ACS Applied Bio Materials*, v.2, p.4790 - 4800, 2019.

- **Artigos publicados em co-autoria:**

1. Borçari, NR; Santos, JF; Santos, SIF; Alcalde, FSC; Azevedo-Martins, AK; Nunes, VA. Estrogens modulate progesterone receptor expression and may contribute to progesterone-mediated apoptotic β -cell death. *Endocrinology & Metabolism International Journal*. v6(2), p. 142 – 147, 2018.
2. Borçari, NR; Santos, JF; Reigado, GR; Freitas, BL; Araújo, MS; Nunes, VA. Vitamins Modulate the Expression of Antioxidant Genes in Progesterone-Treated Pancreatic β Cells: Perspectives for Gestational Diabetes Management. *International Journal of Endocrinology* 2020.
3. Reigado, G. R. ; Adriani, P. P. ; Santos, J. F. ; Freitas, B. L. ; Fernandes, M. T. P. ; Alcalde, F.S.C. ; Leo, P. ; Nunes, V. A. . Delivery of superoxide dismutase by TAT and Abalone peptides for the protection of skin cells against oxidative stress. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022.

- **Artigos em processo de submissão em co-autoria:**

1. Myrian Fernandes; Jeniffer dos Santos; Bruna Freitas; Gustavo Reigado; Fernanda Antunes; Nayara Tessarollo; Felipe Alcalde; Bryan Strauss; Viviane Nunes. Reporter system controlled by the involucrin promoter as a tool to follow the epidermal differentiation. Submetido à Revista Scientific Reports. [pre print]

- **Capítulo de livro em co-autoria:**

1. Freitas, Bruna Letícia; Santos, Jeniffer Farias Dos; Carvalho, Carla Roberta De Oliveira ; Nunes, Viviane Abreu. Efeito do extrato de uncaria tomentosa e palmitato sobre a morte celular de mioblastos C2C12. 1ed.: atena editora, 2020, p. 173-183.

- **Prêmios:**

1. Top downloaded paper 2018-2019. Journal of Cellular Biochemistry.
2. Projeto intitulado “Produção de modelo de epitélio pulmonar 3D in vitro para avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos com a insuficiência respiratória aguda grave” escolhido para participar da Campanha “Unidos no Combate à COVID-19, Biocelltis Biotecnologia.

- **Financiamentos obtidos:**

1. Bolsa de doutorado em Biotecnologia

Processo CNPq: N.41050/2019-5

Título do projeto: Estabelecimento de modelo tridimensional de epiderme *in vitro* a partir de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical: perspectivas para o uso na engenharia tecidual

Coordenadora: Viviane Abreu Nunes

Vínculo: aluna de doutorado

Vigência: Setembro de 2017 até o momento.

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2. Bolsa de doutorado sanduíche em Biofísica

Processo CAPES: N. 88887.152230/2017-00

Local: Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia (Portugal)

Título do projeto: Efeito antioxidante de biomateriais de eletrospinning funcionalizados com lipossomas contendo epigallocatequina-3-galato: perspectivas de uso na cicatrização de feridas da pele

Coordenadora: Maria de Fátima Raposo

Vínculo: aluna de doutorado sanduíche

Vigência: Dezembro de 2017 a Novembro de 2018

3. Bolsa de doutorado sanduíche empresarial

Processo CNPq: N.302030/2020-4

Local: Biocelltis Biotecnologia S/A, Florianópolis, SC, Brasil.

Título do projeto: Epiderme humana reconstruída in vitro a partir de células-tronco mesenquimais cultivadas sobre CellFate®

Coordenador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Vínculo: aluna de doutorado empresarial

Vigência: Janeiro de 2021 a Junho de 2021

• **Colaborações em Projetos de Pesquisa:**

1. Projeto FINEP

Financiador(es): Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP

Título do projeto: Plataforma tridimensional para estudos in vitro do coronavírus no epitélio pulmonar e desenvolvimento de alvos terapêuticos

Empresa: TissueLabs Pesquisa e Desenvolvimento Ltda.

Coordenador: Gabriel Romero Liguori

Vínculo da pesquisadora: Especialista em biologia molecular

Vigência: Outubro 2020 a Outubro 2021

Integrantes: Jeniffer Farias dos Santos; Viviane Abreu Nunes; Gabriel Romero Liguori (Responsável); Viktor Sinkunas; Emerson Galves Moretto; Bianca Carla Silva Campitelli de Barros; Juliana Terzi Maricato

2. Projeto FAPESC – Demanda Emergencial COVID-19

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina-FAPESC

Título: Funcionalização direcionada para a construção de modelo de epitélio pulmonar in vitro para atendimento de demanda emergencial da COVID-19

Vínculo da pesquisadora: Especialista em biologia molecular e cultura 3D

Coordenador: Janice Koepp

Vigência: Novembro 2020 a Novembro 2021

Integrantes: Jeniffer Farias dos Santos; Viviane Abreu Nunes; Fernanda Vieira Berti; Janice Koepp

- **Participação em eventos**

1. 48° Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Antioxidant effect of EGCG-liposome functionalized electrospun nanofibers: perspectives for wound healing. 2019. (Congresso).
2. 1° Workshop de Bioimpressão aplicado à saúde: perspectivas e desafios. 2019. (Outra).
3. I Congresso {Virtual} Brasileiro de Engenharia de Tecidos. 2020. (Congresso).
4. I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB). Minicurso: Introdução à Bioengenharia. 2020. (Congresso).
5. I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB). Minicurso: Portal Bonsai ? Sistema de Gerenciamento Laboratorial. 2020. (Congresso).
6. III Fórum Latino Americano de Engenharia Química com a temática - Engenharia Química: carreira e possibilidades. 2020. (Simpósio).
7. XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. Use of the CellFate iN® for a three-dimensional in vitro model of human lung epithelium. 2021. (Congresso).