

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA
E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE TOXICOLOGIA

Julia de Toledo Bagatin

Modelos avançados de pele humana 3D *in vitro*: epiderme bioimpressa e pele tricamada contendo hipoderme para avaliação de segurança e mimético de dermatite atópica no caute de IL-13R α 2 para estudo da função barreira

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA
E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE TOXICOLOGIA

Julia de Toledo Bagatin

Modelos avançados de pele humana 3D *in vitro*: epiderme bioimpressa e pele tricamada contendo hipoderme para avaliação de segurança e mimético de dermatite atópica nocaute de IL-13R α 2 para estudo da função barreira

Versão Corrigida

Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientadora:
Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B144m Bagatin, Julia de Toledo
Modelos avançados de pele humana 3D in vitro: epiderme bioimpressa e pele tricamada contendo hipoderme para avaliação de segurança e mimético de dermatite atópica nocaute de IL-13R α 2 para estudo da função barreira / Julia Bagatin. - São Paulo, 2023. 153 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Orientadora: Maria-Engler, Silvy

1. Modelos de pele in vitro. 2. Bioimpressão. 3. Dermatite atópica. 4. Pele tricamada contendo hipoderme. 5. Métodos alternativos para segurança e eficácias de produtos. I. T. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientadora.

Julia de Toledo Bagatin

Modelos avançados de pele humana 3D *in vitro*: epiderme bioimpressa e pele tricamada contendo hipoderme para avaliação de segurança e mimético de dermatite atópica nocaute de IL-13R α 2 para estudo da função barreira

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de Doutora de Ciências

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

SÃO PAULO, 18 de dezembro de 2023.

“Não é o crítico que conta; Não é o homem que aponta como o homem tropeça, ou onde o fazedor de ações poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está realmente na arena, cuja face está manchada pela poeira, suor e sangue; Que se esforça valentemente; Que erra, que “quase chega lá” repetidamente, porque não existe nenhum esforço sem erro ou falha; Mas quem realmente se esforça para finalizar as obras; Que se consome numa causa digna; Que, no melhor dos casos, conhece no final o triunfo da alta realização e que, no pior dos casos, se falhar, pelo menos falhará tendo ousado tentar, de modo a que o seu lugar nunca estará com aquelas almas frias e tímidas que não conhecem a vitória ou a derrota.”

Discurso de Theodore Roosevelt, França, 23 de Abril de 1910

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, à minha família, que com a leveza de nossa harmonia, não me falta carinho e apoio para sempre seguir em frente, não importa o quão difícil seja o caminho. Vocês são a âncora do meu barco que sempre encontra a areia e me estabiliza no mar da vida mesmo em períodos de tempestade, mas que ao mesmo tempo sempre me incentivam a viajar longe. Inês, Ericson, Cassio, Laura, Maitê e Otávio, eu amo vocês com todo meu coração.

Agradeço a meus exemplos acadêmicos da família, minha tia Ediléia e novamente meu pai, Ericson, pelo incentivo a trilhar o caminho resiliente e criativo da pós-graduação.

Agradeço a todos meus amigos, que à distância ou mais próximos, sempre tornam nossa vida mais leve e gostosa, além de todo apoio e incentivo.

À minha orientadora e amiga, Silvy Stuchi, o exemplo perfeito de liderança, tão querida, humana e ao mesmo tempo exigente, agradeço a todas as vezes acreditou em mim, muitas vezes mais vezes que eu a mim mesma. Agradeço por acreditar em mim e soltar a corda ao confiar em mim e ao mesmo tempo sempre colocar meus pés no chão quando preciso. Você me deu oportunidades que me fizeram crescer tanto como pessoa e profissional. Carrego comigo todos seus conselhos e ensinamentos em mim.

A todos meus amigos do laboratório, agradeço por toda amizade e convivência nesses anos. A nossa harmonia e união tão gostosa de conviver nos permitiram crescer em todos os sentidos, muito além do acadêmico e técnico para a resolução de problemas e aprimoramento das pesquisas, nossos papos cabeças ou de besteiras sempre me fizeram ir ao trabalho com felicidade. Julia, Renaira, Manoel, Rodrigo, Larissa, Ylana, Silvia Romano, Yasmin, Andressa, Sophia, Silvia Berlanga, Walter, vou sentir saudades do cotidiano com vocês. A Denisse, meu agradecimento especial, por ser minha parceira e amiga, nos experimentos, artigo, e nos meus desabafos pessoais.

Agradeço a todos do departamento de Fisiopatologia e Toxicologia, incluindo Elaine, Edna e Samanta por todo suporte da secretaria, e a todos laboratórios parceiros, que principalmente no bloco 17, sempre se dispuseram a emprestar materiais e conhecimentos.

Ao laboratório e ao Prof. Yves Poumay da Universidade de Namur, agradeço o acolhimento e todo conhecimento riquíssimo passado, tanto cientificamente quanto culturalmente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço à agência de fomento da CAPES pelo intercâmbio à Bélgica por 6 meses (88887.695859/2022-00), e pela bolsa de estudos durante todo doutorado (88887.363766/2019-00). Agradeço também à FAPESP pelo auxílio a pesquisa do projeto regular 2019/14527-7 e do temático 2017/04926-6.

PREFÁCIO

Os modelos avançados tridimensionais miméticos de pele humana são extremamente úteis para a indústria farmacêutica e cosmética por sua funcionalidade como plataforma para a avaliação da segurança e eficácia de produtos e para o estudo de doenças dermatológicas como um modelo preditivo e de maior representação ao observado na pele humana *in vivo* em relação ao teste em animais.

Os estudos pré-clínicos para determinação de eficácia e segurança de substâncias químicas e medicamentos são baseados em experimentação usando modelos animais e cultura de células em monocamada há mais de 60 anos. Atualmente, há uma alta demanda por um sistema de avaliação pré-clínica da segurança e eficácia de cosméticos e medicamentos mais representativa à biologia humana, e assim, com maior predição das respostas farmacológicas nos ensaios clínicos.

Primeiramente, o alto custo e tempo despendido em testes de segurança usando modelos animais não abarca a quantidade de novas substâncias químicas descobertas anualmente. Estima-se que apenas 10% das mais de 80 milhões de substâncias químicas já descobertas ou sintetizadas tenham sido exploradas em testes pré-clínicos. Assim existe a necessidade de plataformas de triagem de substâncias *in silico* e *in vitro* que suportem largas escalas, com abordagem rápida, alto rendimento, reprodutibilidade e com melhor relevância à fisiologia humana (HARTUNG, 2009).

Para a indústria farmacêutica, embora ainda sejam amplamente utilizados até a atualidade e não possam ser desconsiderados na cadeia produtiva de medicamentos, o uso de animais na etapa pré-clínica apresentam uma alta proporção de resultados falso-positivos durante os ensaios clínicos, sendo controversos para prever a resposta farmacológica ou toxicológica de substâncias químicas e medicamentos em seres humanos. Geralmente, cerca de 89% dos novos fármacos em potencial não são bem-sucedidos nos estudos clínicos. Dentre essas falhas, aproximadamente metade ocorre devido a efeitos tóxicos inesperados em humanos, que não foram previstos nos estudos pré-clínicos (Van Norman, 2019; Seyhan, 2019, Singh e Seed, 2021). Para medicamentos oncológicos, a falha na tradução das respostas de estudos pré-clínicos para a etapa clínica chega a 92% (Mak; Evaniew; Ghert, 2014).

Na União Europeia, a utilização de animais para testes de produtos cosméticos foi totalmente banida em 2013 (Scholz et al., 2013). Uma tendência em progresso no Brasil e que foi iniciada a partir do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que sugere o uso de métodos alternativos, substituindo estudos em animais, seguindo o guia internacional da OECD (*The Organization for Economic Co-operation and Development*), ao qual tem descrito entre outros métodos experimentais, o uso de modelos de pele tridimensionais *in vitro* para testes de segurança, como os de irritação e corrosão cutânea. Dessa forma, o uso destes métodos no Brasil entrou em vigor em 2019 e 2021, após o prazo de 5 anos para ser implementado nacionalmente a partir dos artigos N° 4 e 5 das resoluções de 2014 e 2016 (Resolução normativa N° 18, de 24 de setembro

de 2014 e a N° 31, de 18 de agosto de 2016) (CONCEA, 2014, 2016). Logo, os modelos miméticos de pele apresentam alta demanda no Brasil, porém a validação de miméticos nacionais para a avaliação de segurança e eficácia a nível regulatório ainda é limitada.

Por muito tempo, as culturas celulares isoladas e co-culturas em modelos bidimensionais foram muito valiosas para a elucidação das variadas funções da pele, incluindo a compreensão da biologia molecular e morfogênese tecidual (Tibbitt; Anseth, 2009). Entretanto, estes modelos não permitem a cinética celular completa, demonstrando diferenças no fenótipo, proliferação, sinalização e migração celular, e até respostas distintas a medicamentos quando as mesmas células crescem em monocamada em oposição às condições de culturas tridimensionais (3D) (Mazzoleni; Di Lorenzo; Steimberg, 2009; Ravi et al., 2015; Sun et al., 2006). Consequentemente, os modelos de cultura 3D apresentam grande importância para a obtenção de respostas a questões fisiopatológicas com maior nível de evidência e confiabilidade que em modelos de monocamada (Langhans, 2018).

Deste modo, a reconstrução de um modelo de pele tridimensional, incluindo os componentes dérmicos e epidérmicos, proporcionam uma alternativa representativa à pele humana por sua arquitetura e microambiente *in vitro* mais complexo em relação à tradicional cultura em monocamada (Brohem et al., 2011; Kim et al., 2019; Sun et al., 2006; Zhao et al., 2016). Portanto, fornecem uma plataforma mais fidedigna para os estudos da biologia da pele, de suas aplicações terapêuticas para o reparo de ferimentos e enxertos e para o desenvolvimento científico e tecnológico de métodos alternativos ao uso de animais para os testes de segurança e eficácia de medicamentos tópicos e cosméticos (Camarena et al., 2020; Hieda et al., 2020).

Sempre acompanhando as tendências mundiais, estes modelos de pele reconstruída foram desenvolvidos com sucesso e pioneirismo no Brasil pelo nosso grupo situado na FCF-USP, levando a um grande avanço das plataformas alternativas para testes de segurança e eficácia de produtos farmacêuticos e cosméticos em território nacional, já que por questões alfandegárias, a importação de modelos de pele 3D comercialmente disponíveis era inviável (Maria-Engler, 2010). Nosso grupo desenvolveu e testou esse modelo, comparando-o com modelos de referência. Os resultados mostraram uma eficácia e reprodutibilidade compatíveis, permitindo pioneiramente no Brasil sua aplicação na triagem de vários produtos e ingredientes para uso tópico. Assim, nos últimos 10 anos vários modelos de equivalentes de pele foram construídos por nosso grupo como alternativas aos modelos animais (Brohem et al., 2011; Camarena et al., 2020), permitindo a avaliação da segurança da pele por testes toxicológicos de irritação, corrosão, sensibilização, fototoxicidade e genotoxicidade (Catarino et al., 2018; Crepaldi, 2013; Do Nascimento Pedrosa et al., 2021; Hieda et al., 2020; Maria-Engler, 2016; Mini et al., 2020, 2021; Pedrosa et al., 2017; Zaroni et al., 2014, 2018); eficácia e avaliação dos efeitos farmacológicos de compostos (Pedrosa, 2016); além de modelos que simulam dermatoses e processos fisiológicos como: dermatite atópica (Do Nascimento Pedrosa et al., 2017), melanoma para estudos de desenvolvimento de fármacos (De Oliveira; Goding; Maria-Engler, 2021) e pele envelhecida (Maria-Engler, 2017; Pennacchi et al., 2015).

Apesar de modelos de pele cultivadas *in vitro* estarem disponíveis há alguns anos e muito explorada por nosso grupo, este modelo ainda pode progredir em sua arquitetura estrutural tanto na organização e deposição das células e do meio extracelular, quanto em relação à incorporação de outros tipos celulares, como os adipócitos, e outros tecidos adjacentes, ampliando a representatividade da pele humana (Min et al., 2018; Yan et al., 2018).

Assim, para auxiliar a atingir este objetivo, a tecnologia de bioimpressão disponibiliza ferramentas necessárias para levar este mimético de pele humana a um patamar mais próximo ao microambiente da pele *in vivo*, o que é de grande interesse para as indústrias cosméticas e farmacêutica (Yan et al., 2018). Além disso, a inserção da hipoderme num mimético de pele humana tem o potencial para ser utilizado para o estudo da biologia da pele humana, além de representar um modelo *in vitro* mais representativo da pele *in vivo*, com potencial de responder de forma mais relevante como plataforma para testes de segurança e eficácia de cosméticos. Por fim, modelos miméticos de pele que representam doenças eczematosas, como a dermatite atópica, podem ser geneticamente modificados para o estudo da biologia molecular envolvida na sua patogênese.

Portanto, esta tese aborda diferentes temas relacionados a modelos miméticos de pele humana para fins de pesquisa de doenças dermatológicas e para aprimoração de uma plataforma mais representativa à pele humana *in vivo* para testes da eficácia e segurança de produtos químicos, farmacêuticos e cosméticos. Assim, no Capítulo I, investigamos a aplicação da bioimpressão tridimensional da epiderme humana reconstruída *in vitro* para a realização de testes de irritação cutânea. No Capítulo II, exploramos o papel que a hipoderme pode desempenhar para a homeostase da epiderme, em um modelo de pele contendo as três camadas representativas da pele humana: epiderme, derme e hipoderme. Finalmente, no Capítulo III, estudamos o papel da expressão da IL13R α 2 na epiderme humana reconstruída e sua influência na função barreira da pele, representando os resultados obtidos no doutorado sanduíche realizado na Bélgica.

RESUMO

BAGATIN, J. T. Modelos avançados de pele humana 3D *in vitro*: epiderme bioimpressa e pele tricamada contendo hipoderme para avaliação de segurança e mimético de dermatite atópica nocaute de IL-13R α 2 para estudo da função barreira. 2023. 151 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A reconstrução de modelos avançados de pele tridimensional *in vitro*, que corresponda de forma mais fidedigna ao complexo microambiente da pele humana, depende da utilização de inovações tecnológicas e da adição de novos tipos celulares representativos da pele humana. Desta maneira, estes miméticos fornecem uma plataforma de alta relevância para estudos de fisiopatologia da pele, além de propiciar um sistema para a avaliação da segurança e eficácia de cosméticos e medicamentos alternativo ao uso de animais.

Dessa maneira, o Capítulo I compara a performance de uma epiderme reconstruída humana (RHE) bioimpressa com a manual utilizando o teste *in vitro* de irritação cutânea descrito no guia OCDE número 439. Nossos resultados demonstram que ambos os modelos de pele exibiram morfologia estratificada e a função barreira epidérmica equivalente aos modelos validados. Nos testes de irritação *in vitro*, ambos modelos distinguiram corretamente as substâncias de referência, classificadas entre irritantes ou não-irritantes de acordo com o limiar de viabilidade de 50%. Esse resultado indica que a bioimpressora poderia ser de grande utilidade para a automação da reconstrução de modelos epidérmicos.

O tecido hipodérmico possui importante papel na homeostase da pele humana. O Capítulo II aborda a reconstrução de uma pele tricamada, contendo a camada hipodérmica, além da epiderme e derme. Usando esferoides de adipócitos diferenciados *in vitro*, um modelo de pele tricamada em matriz de colágeno foi construído. Ao comparar este com a pele bicamada obtivemos maior expressão de loricrina e involucrina no modelo tricamada, indicando um potencial para maior função barreira, além de maior expressão de PPAR- γ . Testes de função barreira através da resistividade elétrica não demonstraram diferenças entre os modelos, mas a aplicação de SDS a 5 mg/ml por 18 horas induziu o aumento da viabilidade na pele tricamada. Além disso, após a aplicação de SDS a 2,5% para induzir uma irritação aguda, seguida de recuperação por 42h, obtivemos maior viabilidade na pele tricamada, indicando melhor recuperação pós-lesão irritativa induzida. A pele tricamada é promissora para estudos do metabolismo da pele humana e recuperação de lesões.

A dermatite atópica (DA) é uma doença eczematosa de pele caracterizada por inflamação do tipo Th2 e alteração da barreira epidérmica. IL-13 e IL-4 são centrais no comprometimento da barreira epidérmica na DA. Entre os receptores de IL-13 em queratinócitos, o receptor IL-13R α 2, tem um papel controverso na alteração da barreira cutânea. O objetivo do Capítulo III foi estudar a deleção da expressão de IL-13R α 2 em RHE, que foram expostas a IL-4 e IL-13, e avaliadas conforme a expressão dos receptores e de proteínas alteradas na DA. As epidermes com *knockout* em IL-13R α 2 apresentaram redução da expressão de NELL2 ($p < 0,0021$), tipicamente aumentadas na DA. Além disso, houve redução da expressão do receptor do IL-2R γ . Assim, um possível papel de exacerbação da DA do receptor IL-13R α 2 deve ser estudado mais extensamente para ser caracterizado.

Palavras-chave: Modelos de pele *in vitro*; Bioimpressão; Dermatite atópica; Pele tricamada contendo hipoderme; Métodos alternativos para segurança e eficácias de produtos.

ABSTRACT

BAGATIN, J. T. Advanced in vitro 3D human skin models: bioprinted epidermis and trilayer skin containing hypodermis for safety assessment and atopic dermatitis mimetic with IL-13R α 2 knockout for barrier function study. 2023. 151 p. PhD – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The reconstruction of advanced three-dimensional in vitro skin models, which more reliably correspond to the complex microenvironment of human skin, depends on the use of technological innovations and the addition of new cell types representative of human skin. In this way, these mimetics provide a highly relevant platform for studies of skin pathophysiology, in addition to providing a system for evaluating the safety and efficacy of cosmetics and medicines alternative to animal use.

In this way, Chapter I compares the performance of a bioprinted human reconstructed epidermis (RHE) with a manual one using the in vitro skin irritation test described in OECD guide number 439. Our results demonstrate that both skin models exhibited stratified morphology and the epidermal barrier function equivalent to validated models. In in vitro irritation tests, both models correctly distinguished the reference substances, classified as irritating or non-irritating according to the viability threshold of 50%. This result indicates that the bioprinter could be of great use for automating the reconstruction of epidermal models

Hypodermic tissue plays an important role in the homeostasis of human skin. Chapter II addresses the reconstruction of a three-layer skin, containing the hypodermic layer, in addition to the epidermis and dermis. Using in vitro differentiated adipocyte spheroids, a trilayer skin model in collagen matrix was constructed. When comparing this with bilayer skin, we obtained greater expression of loricrin and involucrin in the trilayer model, indicating a potential for greater barrier function, in addition to greater expression of PPAR- γ . Barrier function tests using electrical resistivity did not demonstrate differences between the models, but the application of SDS at 5 mg/ml for 18 hours induced an increase in viability in the three-layer skin. Furthermore, after applying 2.5% SDS to induce acute irritation, followed by recovery for 42 hours, we obtained greater viability in the three-layer skin, indicating better recovery after induced irritant injury. Trilayer skin holds promise for studies of human skin metabolism and injury recovery.

Atopic dermatitis (AD) is an eczematous skin disease characterized by Th2-type inflammation and alteration of the epidermal barrier. IL-13 and IL-4 are central to the impairment of the epidermal barrier in AD. Among the IL-13 receptors on keratinocytes, the IL-13R α 2 receptor has a controversial role in altering the skin barrier. The objective of Chapter III was to study the deletion of IL-13R α 2 expression in RHE, which were exposed to IL-4 and IL-13, and evaluated according to the expression of receptors and proteins altered in AD. Epidermis with IL-13R α 2 knockout showed reduced NELL2 expression ($p < 0.0021$), typically increased in AD. Furthermore, there was a reduction in the expression of the IL-2R γ receptor. Therefore, a possible AD exacerbation role of the IL-13R α 2 receptor should be studied more extensively to be characterized.

Keywords: In vitro skin models; Bioprinting; Atopic dermatitis; Trilayer skin containing hypodermis; Alternative methods for product safety and efficacy.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I. Epiderme humana reconstruída bioimpressa *in vitro* para testes de irritação cutânea

Figura 1. Mecanismos de bioimpressão e seus componentes.	24
Figura 2. Bioimpressora modelo BioEnder da startup BioEdTech. Trabalha com mecanismo de microextrusão por pistões mecânicos para deposição precisa de soluções com baixa viscosidade.	30
Figura 3. Desenho tridimensional da bioimpressão no programa 3D Builder (Microsoft).	31
Figura 4. Programação em modo de pré-visualização com a rota da bioimpressão no programa Simplify3D.....	32
Figura 5. Etapas iniciais do isolamento de células cutâneas primárias a partir das amostras de postectomia.	41
Figura 6. Imagem microscópica ilustrativa para apreciação da pureza das culturas, isto é, indicando que não há contaminação entre os dois tipos celulares (A) Queratinócitos (#131 P0) e (B) fibroblastos (#131 P0) isolados a partir das amostras de postectomia.	41
Figura 7. Análise eletroforética dos fragmentos de material genético amplificados oriundo das amostras de células isoladas das peles humanas para avaliação de presença de 5 diferentes microrganismos usando RT-PCR nos pacientes 130 a 139.....	42
Figura 8. Análise histológica em seções verticais de parafina coradas com hematoxilina e eosina de (A) epiderme humana nativa e (B) comparação entre epiderme humana reconstruída (RHEs).	44
Figura 9. Imunofluorescência dos modelos de epiderme humana reconstruída bioimpressa e manual com marcação dos anticorpos de proliferação Ki67, marcadores de proteínas de estratificação (citoqueratina 10 e 14, KRT10 e KRT14) e proteínas de diferenciação terminal IVL, FLG, LOR em RHEs manuais e bioimpressos. Os núcleos são corados com DAPI. As setas amarelas indicam núcleos corados para ki67. Barra de escala amarela: 50 µm. Barra de escala branca: 20 µm.	45
Figura 10. Caracterização histológica das epidermes bioimpressa e manual nas diferentes concentrações de SDS aplicadas no ensaio de função barreira, em microscópio óptico. Barra de escala = 50µm. Ampliação = 100x.	47
Figura 11. Avaliação da função barreira dos modelos de epiderme humana reconstruída por método manual e bioimpresso. A viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações de SDS (0; 1,25; 2,5 e 5 mg/ml) foi usada para a determinação da viabilidade de 50% (IC50) em três experimentos independentes (média e desvio padrão).	47
Figura 12. Avaliação <i>in vitro</i> da irritação cutânea a 6 substâncias de referência (a) não irritantes e (b) irritantes de acordo com teste de irritação descrito na OCDE GD 439. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	50
Figura 13. Análise histológica das RHEs após aplicação de substâncias não irritantes.	52
Figura 14. Análise histológica das RHEs após aplicação de substâncias irritantes.	53
Figura 15. Concentração de IL-1 alfa secretados a partir do sobrenadante da cultura após 24 horas a exposição às substâncias de referência no ensaio de irritação.	54
Figura 16. Avaliação dos queratinócitos após processo de bioimpressão em até 96h de incubação após semeadura por técnicas manuais e bioimpressão.	55
Figura 17. Índice proliferativo estipulado através do número de células proliferativas em relação ao número total de células, em porcentagem.....	57

Figura 18. Contagem de células viáveis por azul de tripano após bioimpressão em placa de 12 poços.....	58
---	----

Capítulo II. Pele humana reconstruída contendo hipoderme

Figura 1. Separação de fases das amostras de lipoaspiração após centrifugação.	79
Figura 2. Morfologia de (A) células 3T3-L1 da referência ATCC e (B) da cultura das células 3T3-L1 adquiridas em cultura em microscópio óptico.	92
Figura 3. Comparação da diferenciação de células 3T3-L1 após 10 dias de cultura de 6 grupos distintos de meio de indução adipogênica corados com Oil Red O em microscópio óptico (aumento de 10x).	94
Figura 4. Etapas do isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes a partir de amostras de tecido adiposo abdominal.	96
Figura 5. Células estromais mesenquimais humanas multipotentes isoladas, observadas em microscópio óptico (aumento de 10x) obtidas a partir de amostras de tecido adiposo (A) e de lipoaspiração (B).	97
Figura 6. Dot plot da marcação tripla com os anticorpos positivos anti-CD90, CD105 e CD73 e complexidade interna das células dos pacientes (#1 a #6) em singlet por citometria de fluxo.	98
Figura 7. Caracterização dos esferoides mantidos em cultura de meio de diferenciação até 20 dias.	100
Figura 8. Fotomicrografias de histologia (coloração de hematoxilina e eosina) de pele normal com adipócitos.	101
Figura 9. Fotomicrografias de imunocoloração pele tricamada do protocolo I (método junto).	103
Figura 10. Fotomicrografias morfológicas das células adipócitas na pele in vitro - Protocolo I.	104
Figura 11. Fotomicrografias de imunocoloração pele tricamada do protocolo II (método separado).	106
Figura 12. Fotomicrografias morfológicas das células adipócitas na pele in vitro - Protocolo II.	107
Figura 13. Microfotografias dos esferoides de adipócitos (A), medida do diâmetro dos esferóides (B) e secreção de adiponectina (C), conforme o tempo de cultura.	109
Figura 14. Adiponectina secretada no meio de cultura no 11º dia pós-construção dos modelos de pele.	110
Figura 15. Expressão proteica de marcadores de estratificação e diferenciação epidérmica, citoqueratina 10 (CK10) e 14 (CK14), loricrina e involucrina por Western Blotting.	111
Figura 16. Expressão proteica de PPAR- γ por Western Blotting.	111
Figura 17. Avaliação da função barreira dos modelos de pele bicamada e tricamada. A viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações de SDS (0; 1,25; 2,5 e 5 mg/ml).	112
Figura 18. Resistividade elétrica transepitelial (TEER) dos modelos de pele normal e pele tricamada (média e desvio padrão).	113
Figura 19. Avaliação viabilidade celular por MTT dos modelos de pele humana reconstruída normal e tricamada após aplicação de SDS nas concentrações descritas para indução da irritação aguda por 15 min.	114
Figura 20. Concentração de IL-1 α e IL-8 secretados a partir do sobrenadante da cultura após 42h horas da exposição aguda ao SDS nas concentrações 0 e 2,5%.	114

Capítulo III. Nocaute da expressão de IL13R α 2 em Epiderme Humana Reconstruída para estudar alteração de barreira

Figura 1. Vias de sinalização de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) em queratinócitos.	135
Figura 2. Expressão dos produtos de amplificação das regiões correspondentes ao exon 4 e exon 10 dos clones 7-14 e 20-31 por PCR.....	142
Figura 3. Deleções do gene IL13RA2 usando o método de CRISPR/Cas9 em queratinócitos de linhagem N/TERT e genotipagem dos clones com a deleção alvo.	143
Figura 4. Cortes histológicos em parafina coradas com hematoxilina e eosina da epiderme humana reconstruída (RHEs) a partir dos queratinócitos N/TERT em comparação com os clones com deleção em IL13R α 2 sob tratamento com IL-4 ou IL-13 por 48 horas.	144
Figura 5. Imunofluorescência dos modelos de epiderme humana reconstruída a partir dos queratinócitos N/TERT em comparação com os clones com deleção em IL13R α 2 sob tratamento com IL-4 ou IL-13 por 48 horas com marcação de proteínas de estratificação citoqueratina 10 (CK10) e de diferenciação terminal filagrina (FLG). Os núcleos são corados em azul com Hoesch.	145
Figura 6. Expressão de mRNA do receptor IL13RA2 referentes a sequência localizada dentro do local da deleção (IN – exon 8) e fora da deleção (OUT – exon 3) foram avaliados através de RT-qPCR. RPLP0 foi usado como gene de referência. Os valores são expressos em relação ao controle interno de cada grupo (clones) e tratamento (ILs).	147
Figura 7. Quantificação de IL13RA2 por ELISA coletada do meio de cultura após o tratamento com IL-4 e IL-13 por 48h na cultura das epidermes humanas reconstruídas.	147
Figura 8. Expressão de mRNA das proteínas CA2, NELL2, LOR e FLG foram avaliados através de RT-qPCR. RPLP0 foi usado como gene de referência. Os valores são expressos em relação ao controle interno de cada grupo (clones) e tratamento (ILs).	148
Figura 9. Expressão de mRNA dos receptores do tipo I (IL-2R γ) e II (IL-13R α 1) foram avaliados através de RT-qPCR. RPLP0 foi usado como gene de referência. Os valores são expressos em relação ao controle interno de cada grupo (clones) e tratamento (ILs).	149
Figura 10. Expressão proteica por Western Blotting da ativação de STAT6 (p-STAT6) nas RHE controle (NTERT) e clones 10, 14, 22 e 30 após tratamento com IL-4, IL-13 ou não-tratado (NT).	150

LISTA DE TABELAS

Capítulo I. Epiderme humana reconstruída bioimpressa *in vitro* para testes de irritação cutânea

Tabela 1. Parâmetros da bioimpressão alterados dos padrões iniciais do programa PrusaSlicer.	31
Tabela 2. Substâncias de proficiência descritas no Guia OECD 439.	37
Tabela 3. Lista de pacientes doadores de pele para o isolamento de células primárias cutâneas.	40
Tabela 4. Comparação entre a função barreira do modelo RHE bioimpresso e manual em com os modelos validados para irritação cutânea descritos no guia OECD nº 439.	48
Tabela 5. Comparação da viabilidade média dos modelos de RHE bioimpresso e manual e a classificação das substâncias de acordo com os métodos validados de referência do Guia OECD 439.	50
Tabela 6. Número de células marcadas totais (DAPI), células proliferativas (KI67) e índice de proliferação (IP) de três avaliadores independentes comparando as peles manuais e bioimpressas.	57

Capítulo II. Pele humana reconstruída contendo hipoderme

Tabela 1. Descrição dos grupos para indução da diferenciação celular dos adipócitos.	76
Tabela 2. Meios de expansão e diferenciação celular usados em pré- adipócitos 3T3-L1 e células mesênquimas estromais multipotentes (hASCs).	93
Tabela 3. Lista de pacientes doadores de amostras de lipoaspiração ou tecido adiposo para o isolamento de células estromais multipotentes.	97
Tabela 4. Resultado resumo da marcação positiva tripla para os anticorpos do coquetel positivo (CD90, CD105 e CD73) e marcação negativa para os anticorpos do coquetel negativo (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR) com isotipo correspondente.	98

Capítulo III. Nocaute da expressão de IL13R α 2 em Epiderme Humana Reconstruída para estudar alteração de barreira

Tabela 1. sgRNA usado para edição gênica por CRISPR-Cas9 (adquiridos na empresa Integrated DNA Technologies, Bélgica).	138
Tabela 2. Primers usados para amplificação e sequenciamento genômico dos clones com deleção em IL13RA2 (adquiridos na empresa Eurogentec, Bélgica).	139
Tabela 3. Primers usados no RT-qPCR.	140

LISTA DE SIGLAS

ANOVA análise de variância	3T3-L1 linhagem celular de pré-adipócitos murinos
CAS <i>Chemical Abstracts Service</i>	PPAR-γ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> ; receptores ativados por proliferador de peroxissoma
DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	hASC <i>Human adipocytes stromal cells</i> ; células estromais adipócitas humanas
CK10 citoqueratina 10	PCR <i>polymerase chain reaction</i>
CK14 citoqueratina 14	RT-qPCR <i>Real time quantitative PCR</i> ; reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
LOR lorricrina	HLA-DR antígenos leucocitários humanos isótipo DR
FGL filagrina	CRISPR-Cas9 clustered regularly interspaced short palindromic repeats - associated protein 9
INV involucrina	DA dermatite atópica
PBS tampão fosfato-salino	IL-4 interleucina 4
IC50 concentração inibitória redutora de 50% da viabilidade	IL-13 interleucina 13
IL-1α interleucina 1 alfa	IL-13Rα interleucina 13 receptor alfa
EGF fator de crescimento epidérmico	IL-2Rγ interleucina 2 receptor gama
ELISA <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>	NELL2 <i>neuron-specific EGF-like protein</i>
MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio	CA2 anidrase carbônica 2
NaCl Cloreto de Sódio	CD <i>cluster of differentiation</i>
NC controle negativo	TEER resistividade elétrica transepitelial
HEK queratinócitos humanos epidérmicos	KI67 marcador de proliferação celular
OD densidade óptica	IP índice proliferativo
OECD <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> ; Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico	
PC controle positivo	
RHE epiderme humana reconstruída	
DP desvio padrão	
SDS Sulfato Dodecil de Sódio	
TG <i>testing guideline</i> ; guia de teste	
TGF-α fator transformador de crescimento alfa	
B-RHE epiderme humana reconstruída bioimpressa	
M-RHE epiderme humana reconstruída manual	

SUMÁRIO

Capítulo I. Epiderme humana reconstruída bioimpressa <i>in vitro</i> para testes de irritação cutânea	
RESUMO	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVO	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Cultura celular	26
3.1.1. Obtenção de excedentes cirúrgicos de pele humana	26
3.1.2. Isolamento e cultura de células primárias epidérmicas	27
3.1.3. Controle de qualidade das células primárias	28
3.2. Reconstrução do equivalente de epiderme humana manual (M-RHE)	29
3.3. Bioimpressão do equivalente epidérmico (B-RHE)	30
3.3.1. Desenho tridimensional e código computacional da Bioimpressão de Epiderme	30
3.3.2. Bioimpressão de equivalente epidérmico	32
3.4. Ensaio de Irritação <i>In Vitro</i> em Modelo de Epiderme Reconstruída Humana (OECD, Guia nº 439)	33
3.4.1. Caracterização morfológica e funcional das epidermes	33
3.4.2. Avaliação da função barreira da epiderme humana reconstruída bioimpressa	34
3.4.3. Ensaio de Irritação <i>In Vitro</i> em Modelo de Epiderme Reconstruída Humana (OECD, Guia nº 439)	36
3.4.4. Quantificação de interleucina 1 alfa (IL-1 α).....	37
3.5. Influência do uso bioimpressora na viabilidade dos queratinócitos	38
3.6. Dispersão do número de células após ejeção de queratinócitos usando a bioimpressão	39
3.7. Análise estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Cultura celular	40
4.1.1. Isolamento e cultura de células primárias epidérmicas e dérmicas	40
4.1.3. Controle de qualidade das células primárias	41
4.6. Bioimpressão de epiderme humana reconstruída	43
4.8. Caracterização morfológica e funcional das epidermes manual e bioimpressa ...	43
4.8. Avaliação da Função Barreira para o Ensaio de Irritação OECD 439	46
4.9. Avaliação dos modelos de epiderme no teste de irritação <i>in vitro</i> OECD 439	49
4.9.1. Resposta inflamatória (IL-1 α) induzida por irritação química.....	53
4.10. Influência do uso bioimpressora na viabilidade dos queratinócitos	54
3.8. Dispersão do número de células após ejeção de queratinócitos usando a bioimpressão	57

5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	64
7. BIBLIOGRAFIA	65
ANEXO I – Laudo da pesquisa de patógenos das células primárias	69
<u>Anexo II - Paper publicado na revista <i>Bioprinting</i> (CiteScore: 9.1), disponível em https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00251 (BAGATIN <i>et al.</i>, 2023).....</u>	71

Capítulo II. Pele humana reconstruída contendo hipoderme

RESUMO.....	72
1. INTRODUÇÃO	73
1.1. Pele Tricamada Reconstruída <i>in vitro</i> : a importância do tecido adiposo	73
2. OBJETIVOS.....	75
3. MATERIAL E MÉTODOS	76
3.1. Cultura celular.....	76
3.1.1.a. Padronização do meio de diferenciação celular dos pré-adipócitos a adipócitos em cultura	76
3.1.1.b. Avaliação da indução adipogênica.....	77
3.1.2. Isolamento e manutenção das células estromais mesenquimais multipotentes	78
3.1.2.a. Caracterização de fenótipo celular das células isoladas por citometria de fluxo	80
3.3. Desenvolvimento do protocolo de pele tricamada	81
3.3.1. Construção e caracterização dos esferoides de adipócitos	81
3.3.1.1. Construção dos esferoides	81
3.3.1.1.a. Caracterização dos esferoides	82
3.3.2. Construção de pele tricamada <i>in vitro</i>	82
3.3.2.a. Protocolo I: tricamada derme	82
3.3.2.b. Protocolo II: Tricamada derme separada	83
3.3.3. Caracterização histológica e imunohistoquímica da pele tricamada	83
3.4. Comparação entre modelo de pele normal e pele tricamada	84
3.4.1. Esferoides de adipócitos	84
3.4.1.a. Quantificação de adiponectina	85
3.4.1.b. Medida do tamanho do esferóide	85
3.4.2. Construção da pele tricamada e pele normal	85
3.4.2.a. Secreção de Adiponectina.....	86
3.4.2.b. Histologia e Imunohistoquímica	87
3.4.2.c. Avaliação da expressão proteica por Western Blotting	87
3.4.2.d. Função Barreira	88
3.4.2.d.I. Teste de função barreira com SDS por 18 horas.....	88

3.4.2.d.II. Resistividade elétrica	88
3.4.2.e. Teste de irritação aguda	89
3.4.2.e.I. Teste de irritação aguda com SDS	89
3.5. Análise estatística	90
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.1. Cultura celular	91
4.1.1. Obtenção das células 3T3-L1 e diferenciação celular dos pré-adipócitos a adipócitos	91
4.1.1.1. Diferenciação celular dos pré-adipócitos a adipócitos	92
4.1.2. Isolamento das células estromais mesenquimais multipotentes	95
4.1.2.1. Caracterização de fenótipo celular das células isoladas por citometria de fluxo	98
4.2. Desenvolvimento do protocolo de pele tricamada	99
4.2.1. Construção de esferoides	99
4.2.2. Desenvolvimento e Caracterização da pele tricamada <i>in vitro</i>	100
4.2.3. Imunohistoquímica da construção da pele tricamada <i>in vitro</i>	101
4.2.3.a. <i>Pele tricamada obtida com o protocolo I</i>	102
4.2.3.b. <i>Pele tricamada obtida do protocolo II</i>	105
4.3. Comparação entre os modelos de pele tricamada e pele normal	107
4.3.1. Esferoides de adipócitos	108
4.3.2. Comparação pele tricamada com pele normal	110
4.3.2.1. Secreção de Adiponectina	110
4.3.2.2. Expressão de proteínas por Western Blotting	110
4.3.2.3. Função Barreira	112
4.3.3. Teste de irritação aguda com SDS	113
5. DISCUSSÃO	115
6. CONCLUSÃO	125
7. REFERÊNCIAS	126

Capítulo III. Nocaute da expressão de IL13R α 2 em Epiderme Humana Reconstruída para estudar alteração de barreira

RESUMO	134
1. INTRODUÇÃO	135
2. OBJETIVO	137
3. MATERIAL E MÉTODOS	137
3.1. Cultura de células e epiderme humana reconstruída	137
3.2. Inativação de IL13RA2 por CRISPR-Cas9 em queratinócitos	138
3.3. Histologia com Hematoxilina e Eosina e Imunofluorescência	139

3.4.	Extração de RNA e RT-qPCR	139
3.5.	Extração proteica e Western Blotting	140
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
5.	CONCLUSÃO	151
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

CAPÍTULO I

Epiderme humana reconstruída bioimpressa *in vitro* para testes de irritação cutânea

RESUMO

O progresso na bioengenharia de equivalentes de pele depende do aprimoramento da sua relevância e confiabilidade como plataforma para a avaliação da segurança de produtos consumíveis. A bioimpressão 3D permite o controle espacial preciso da deposição de materiais biológicos para atingir um modelo mimético de pele mais relevante e representativo. Ainda que alguns estudos já tenham sido reportados sobre modelos de pele bioimpressa, a comparação primária da utilização da tecnologia de bioimpressão em comparação com o sistema de dispersão tradicional manual para a reconstrução de modelos de epiderme humana (RHE) *in vitro* é escassa na literatura. Dessa maneira, este capítulo compara a performance de uma epiderme reconstruída humana bioimpressa (B-RHE) com uma manual (M-RHE) utilizando o teste *in vitro* de irritação cutânea descrito no guia internacional da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), guia número 439 (TG 439), que valida modelos de RHE para permitir a identificação do perigo irritante de substâncias químicas para avaliação da segurança de produtos. Nossos resultados demonstram que ambos modelos de pele exibiram uma morfologia bem estratificada contendo as múltiplas camadas epidérmicas. A função barreira epidérmica atingiu equivalência na performance em comparação aos modelos validados descritos no guia TG 439. Nos testes de irritação *in vitro*, a performance dos modelos de epiderme bioimpressa foi similar aos da metodologia manual, já que estes distinguiram corretamente as substâncias de referência selecionadas, classificadas entre irritantes ou não-irritantes de acordo com o limiar de viabilidade de 50%. Esse resultado indica que a bioimpressora poderia ser de grande utilidade para a automação da reconstrução de modelos epidérmicos. Porém, uma resposta inflamatória ainda não reportada na literatura foi significativamente maior na metodologia bioimpressa, mesmo na aplicação de substâncias classificadas como não-irritantes. Assim, apesar de o modelo de epiderme bioimpresso ter se qualificado frente a TG 439 para ser usado como plataforma para testes de irritação *in vitro*, a extrusão da bioimpressora que utiliza agulhas cilíndricas pode ser responsável por exacerbar a resposta inflamatória indiretamente. Portanto, o sistema ideal para dispersão dos biomateriais deve ser considerado na tecnologia de bioimpressão de miméticos de tecidos destinadas a serem utilizadas como plataforma para avaliação de risco.

1. INTRODUÇÃO

Como alternativa mais representativa e ética em relação à experimentação animal, os avanços na engenharia de tecidos possibilitam a construção de tecidos miméticos humanos *in vitro* cada vez mais relevantes para os avanços das ciências da saúde (Weng et al., 2021). No entanto, ainda permanecem grandes desafios, que vão desde a produção efetiva de substitutos de tecidos humanos até que os miméticos sejam uma resposta às principais questões biomédicas da atualidade, incluindo o desenvolvimento de medicamentos, avaliação toxicológica, estudos fisiopatológicos e medicina de precisão.

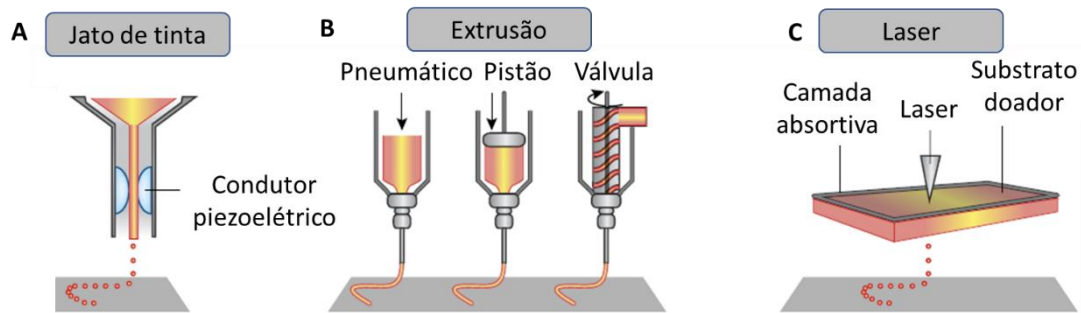
A reconstrução de modelos de epiderme humana fornece uma plataforma validada para avaliação do risco de irritação de produtos tópicos, químicos e cosméticos, mas são necessárias atualizações constantes desses modelos (Madiedo-Podvrsan et al., 2021; Pedrosa et al., 2017). Desta forma, a recente tecnologia de bioimpressão é promissora pelas suas vantagens em automação, escalabilidade e pela possibilidade de realizar uma pré-deposição espacial de biomateriais para obter modelos de pele mais representativos e reprodutíveis (Wei et al., 2020).

A epiderme humana reconstruída (RHE) foi o primeiro tecido humano produzido *in vitro*. Esta conquista foi possível desde que Rheinwald e Green (1975) descobriram o meio de cultura modificado de queratinócitos, e posteriormente, Prunieras, Regnier e Woodley (1983) implementaram esta cultura numa interface ar-líquido. Desde então, o modelo *in vitro* epidérmico típico compreende queratinócitos semeados sobre uma matriz de colágeno por técnicas de pipetagem manual. No entanto, o modelo epidérmico ainda pode progredir na organização e deposição de células e materiais para alcançar modelos miméticos de pele mais representativos e reprodutíveis.

Assim, a bioimpressão 3D é uma tecnologia avançada de fabricação aditiva auxiliada por computador para permitir uma deposição espacial predefinida de células e/ou biomateriais (Murphy & Atala, 2014). A partir de um arquivo no formato *.gcode*, projetado utilizando-se um programa de design computacional, pode-se customizar e automatizar o processo de impressão camada-a-camada com um alto nível de flexibilidade e reprodutibilidade.

Dentre os mecanismos de impressão hoje mais utilizados nas bioimpressoras 3D estão: o mecanismo à laser (Koch et al., 2012; Michael et al., 2013), a jato de tinta ou por gotejamento piezoelétrico (ex.: *inkjet*) (Lee et al., 2013) e o mecanismo por microextrusão (Pourchet et al., 2017; Ng et al., 2016; He et al., 2018), Figura 1.

Figura 1. Mecanismos de bioimpressão e seus componentes.



Fonte: adaptado de MALDA et al., 2013.

No presente estudo, iremos utilizar uma bioimpressora que utiliza o mecanismo de microextrusão por pistões mecânicos. A principal vantagem deste mecanismo frente aos outros, é a flexibilidade na utilização de diversos biomateriais e tipos celulares concomitantemente e a capacidade de se trabalhar com uma ampla faixa de viscosidades (Malda et al., 2013). Além disso, o mecanismo de extrusão tem a vantagem de proporcionar melhor integridade estrutural da construção devido à deposição contínua e precisa de filamentos de alta viscosidade e densidade celular com grande resolução (Mandryck et al., 2016). A típica bioimpressora baseada em extrusão é composta por um sistema de acionamento de seringas estéreis que podem ser carregadas com soluções, misturas ou géis, chamadas de biotintas se contiverem células, e um sistema dispersante acoplado à seringa que dispersa a biotinta através de uma agulha ou ponteira estéril (Choudhury, Anande e Naing, 2018).

Assim, a bioimpressão por extrusão tem potencial para a reconstrução *in vitro* de um modelo mais relevante e representativo do complexo microambiente da pele humana (Madedo-Podvrsan et al., 2021; Ng et al., 2018). Embora a bioimpressão por extrusão seja o tipo de bioimpressora mais utilizado na atualidade (Boularaoui et al., 2020), a comparação com a metodologia manual tradicional por pipetagem para reconstrução de modelos de pele é escassa na literatura.

O processo de impressão da pele 3D é composto por quatro fases: pré-processamento, processamento, pós-processamento e avaliação. 1) Na fase de pré-processamento ocorre o projeto computacional da estrutura a ser bioimpressa, a seleção das células e dos materiais e/ou biotintas a serem utilizadas; 2) O processamento é a etapa efetiva de impressão das estruturas; 3) O pós-processamento inclui a proliferação celular

e maturação do biofabricado após a reconstrução da pele; Por fim, 4) a etapa de validação verifica a funcionalidade do modelo de pele impresso (Yan et al., 2018). Assim, a etapa final do processo de bioimpressão é a validação do produto, realizada por meio de métodos de caracterização e indicadores de performance *in vitro* para demonstrar a funcionalidade e mimetismo da pele reconstruída (Yan et al., 2018).

Para avaliar os miméticos da pele reconstruída, as características a serem alcançadas são: morfologia semelhante à da pele humana, apresentando uma epiderme estratificada contendo todas as camadas representativas com presença positiva de marcadores proteicos de estratificação e função barreira funcional (Boogard et al., 2021). Estas características também são descritas como um controle de qualidade para o uso de modelos epidérmicos para avaliar a segurança de produtos tópicos consumíveis.

As diretrizes internacionais descrevem padrões detalhados de controle de qualidade e desempenho necessários para a validação de modelos RHE (Boogard et al., 2021; OECD TG 439, 2021) a serem usados como plataforma para testes *in vitro* de irritação cutânea. A diretriz 439 (TG 439) da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) dispõe sobre a identificação de perigo de produtos químicos irritantes usando modelos RHE como um método alternativo para o teste de Draize, um teste de toxicidade aguda que aplica a substância de teste diretamente na pele do coelho. Vários modelos RHE estão disponíveis comercialmente em diversas indústrias e instituições acadêmicas. Alguns desses modelos epidérmicos disponíveis comercialmente já são validados internacionalmente para avaliar o potencial irritante de produtos químicos e são mencionados no TG 439 (OECD TG 439, 2021). Mas outras instituições podem validar os seus modelos RHE seguindo os parâmetros exigidos para morfologia, função de barreira e resposta irritante aos produtos químicos de referência e comparar os resultados com os modelos validados, conforme descrito no TG 439 (Pedrosa et al., 2017).

A irritação cutânea é caracterizada por um dano reversível do tecido, após substâncias químico-irritantes permeiam o estrato córneo e geram uma reação inflamatória local na epiderme viável que se manifesta pela liberação de citocinas, eritema e edema (Gaviria et al., 2020). Assim, o teste de irritação cutânea *in vitro* fornece uma excelente plataforma para avaliar características importantes da função da pele, tais como a morfologia da pele, função de barreira e viabilidade contra produtos químicos irritantes. Além disso, como a liberação de citocinas é uma importante via inflamatória para induzir

o reparo cutâneo após o dano irritativo, além dos testes de irritação, também foi avaliada a liberação de interleucina 1 alfa (IL-1 α), a principal citocina inflamatória envolvida na irritação (Feldmeyer et al., 2010).

A heterogeneidade dos estudos experimentais de bioimpressão de pele demonstram que este ainda é um campo na fronteira do conhecimento, o que é evidente por ainda não existir um mecanismo de bioimpressão que apresenta melhor metodologia em relação aos outros. Assim, grandes desafios nessa área e na de biomateriais ainda devem ser superados (Tarassoli et al., 2018), mas estes devem se iniciar pelo básico: a comparação de performance entre uma técnica já validada com novas tecnologias.

Portanto, este projeto inseriu nosso laboratório nesta mesma tendência mundial de inovação biotecnológica através da avaliação de uma metodologia usando a bioimpressão, que poderá representar grandes benefícios às indústrias farmacêuticas e cosméticas para os testes de segurança e eficácia alternativos aos estudos animais.

2. OBJETIVO

O objetivo principal do presente capítulo é a comparação da reconstrução de modelos *in vitro* de epiderme humana utilizando a técnica clássica (pipetagem) com a bioimpressão utilizando o teste de validação de modelos de epiderme para irritação cutânea segundo o guia da OECD nº439.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura celular

3.1.1. Obtenção de excedentes cirúrgicos de pele humana

As amostras de pele para o isolamento das células que compõe a pele para o desenvolvimento dos modelos *in vitro* foram obtidas por doação de excedentes cirúrgicos de postectomia de pacientes jovens, após consentimento esclarecido dos responsáveis pelos pacientes, em colaboração com o Hospital Universitário (USP), seguindo o comitê de ética (CAAE: 76737917.5.1001.0067).

Essas amostras foram identificadas e transportadas ao nosso laboratório em solução fisiológica em recipiente resfriado com gelo (4°C) até o momento do isolamento celular, usualmente realizado no mesmo dia ou no dia seguinte.

3.1.2. Isolamento e cultura de células primárias epidérmicas

As células primárias de queratinócitos e fibroblastos foram separadas a partir das amostras cirúrgicas de pele de postectomia, conforme descritos por Pennacchi e colaboradores (2015).

As amostras de pele foram esterilizadas e descontaminadas de possíveis patógenos por esterilização rápida com banho em etanol 70%, seguida de banhos em tampão fosfato-salino (PBS) contendo ampicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/mL). O tecido adiposo e os vasos sanguíneos foram separados com auxílio de tesoura e pinça estéreis e descartados em lixo branco. Após a limpeza inicial o tecido foi fragmentado com bisturi e incubados em solução de dispase 4 mg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri – EUA) até o dia seguinte em geladeira (4°C) para a digestão enzimática da membrana basal. A partir dessa etapa, adicionou-se soro fetal bovino e as porções dérmica e epidérmica da pele humana foram separadas manualmente com auxílio de pinças estéreis.

A epiderme foi incubada em solução de tripsina por 15 minutos à 37°C e agitada fortemente para desagregação celular. Depois, foi adicionado DMEM com 10% de SFB para inativação enzimática. Posteriormente, a suspensão celular foi filtrada em *cellstrainer* de 100µm, seguido de filtração em filtro de 40µm e centrifugada a 1500 rpm por 3 minutos. O pellet das células epidérmicas e foi ressuspenso em meio para cultivo de queratinócitos (KBM-Gold Keratinocyte Basal Medium suplementados com KGM Gold Bullet Kit - Lonza) e adicionado às placas de cultura de 100 mm, que foram previamente recobertas por 200µL de colágeno IV diluída em DMEM (3mg/ml) e deixadas por 1 hora em incubadora à 37°C. Essa cultura foi mantida em incubadora a 7,5% de CO₂, 37°C. A derme foi incubada com solução de colagenase II (1 mg/ml) em PBS por 4 horas sob agitação constante à 37°C, então esta foi inativada com DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) contendo soro fetal bovino (SFB – Gibco), filtrada em *cell strainer* de 100 µm seguido de um de 40 µm e colocadas em placas de cultura de 100 mm contendo meio para cultivo de fibroblastos (DMEM + 10% de SFB), mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

Após o isolamento celular, as células são congeladas em solução contendo 80% meio de cultura celular, 10% SFB e 10% DMSO em tubos de criogênio e armazenadas no nitrogênio líquido até que necessário o descongelamento para a realização dos experimentos.

3.1.3. Controle de qualidade das células primárias

Após o isolamento das células primárias a partir de amostras de tecidos humanos, estas foram analisadas quanto às possíveis infecções por patógenos comuns para garantir a qualidade das células e segurança do pesquisador, de acordo com Pedrosa et al (2017). A partir do cultivo celular das células isoladas foram extraídos o DNA e RNA total da amostra, que podem conter o material genético de patógenos. O material genético extraído e processado a partir das amostras foi enviado em recipiente com isolamento térmico, resfriado com gelo seco, para a Universidade Estadual de Maringá/PR, onde foi avaliado pela equipe coordenada pela Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos seguintes patógenos: *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*; Herpes virus simplex (HSV-1 e HSV-2); *Mycoplasma genitalium*; *Trichomonas vaginalis*; *Neisseria gonorrhoeae* e Papiloma vírus humano (HPV). Para a extração dos materiais genéticos, os fibroblastos isolados dos pacientes foram cultivados em 2 placas P100 por paciente, até atingir a confluência de 80%.

Para a extração do RNA viral foi usado o kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen™), que consiste em colunas de sílica e reagentes para a seletiva adsorção e dessorção do material genético, seguindo as instruções descritas pelo fabricante. Brevemente, a amostra para a extração do RNA foi composta por 1 ml do sobrenadante das culturas com o *pellet* celular. Um tampão para lise celular Buffer RLT Plus foi adicionado com β-mercaptoetanol à amostra e todo conteúdo foi passado para a coluna de sílica para retenção do DNA. Após centrifugação, a coluna foi descartada e etanol 70% foi adicionado ao volume resultante. O volume foi passado para outra coluna que retém o RNA, essa passa por 3 ciclos de lavagem com tampões específicos (Buffer RW1 e RPE) e depois o RNA foi eluído com água MilliQ. Após a obtenção do RNA, este foi quantificado usando o equipamento espectrofotométrico NanoDrop® 2000 (Thermo-Fisher Scientific). Após a quantificação, o RNA obtido foi convertido para cDNA usando

o kit de transcriptase reversa High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific), que será usado nas análises por RT-PCR, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Para a conversão de RNA, a amostra foi diluída para se obter 1 µg/µl e foram adicionados os nucleotídeos, o primer para a reação e a transcriptase reversa fornecidos no kit. Esta mistura foi adicionada no termociclador (Mj Research Thermal Cycler – Marshall Scientific) por um ciclo de 2 horas e então congeladas no freezer – 80 °C até o momento do envio das amostras, no qual foram acondicionadas com isopor e gelo seco para o transporte.

Para a extração do DNA patogênico foi utilizado o kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific), que também consiste em colunas de sílica e reagentes para a seletiva adsorção e dessorção do material genético, seguindo as instruções descritas pelo fabricante. A amostra corresponde ao pellet celular e 200 µl do sobrenadante da cultura celular. Em síntese, um tampão de lise celular contendo uma mistura de reagentes, proteinase K e o carregador do DNA fornecido no kit foi adicionado por 15 minutos de incubação a 56°C, seguido de 200 µl de etanol absoluto. Então, o volume foi passado para as colunas de sílica, que foram lavados com soluções tamponadas fornecidas no kit (Wash Buffer) e enfim o DNA foi eluído da coluna com 30 µl de água MilliQ. Após a obtenção do DNA, este foi quantificado usando o equipamento espectrofotométrico NanoDrop® 2000 (Thermo-Fisher Scientific) e as amostras foram armazenadas no freezer – 80 °C até o momento do envio das amostras, no qual são acondicionadas com isopor e gelo seco para o transporte.

3.2. Reconstrução do equivalente de epiderme humana manual (M-RHE)

A reconstrução do modelo de epiderme manual seguiu o protocolo estabelecido em nosso laboratório, e publicado por Pedrosa e colaboradores (2017). Em resumo, os queratinócitos primários humanos foram dispersados em insertos para cultura celular na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/inserto (PET, 1,1 cm², Transwell®, Corning, Nova Iorque, EUA) previamente revestidos com colágeno IV (0,03 mg/ml – 54 µL/cm²). Estes foram mantidos submergidos em meio de cultura DMEM e HAM (3:1) contendo os suplementos 5 µg/mL insulina, 0,4 µg/mL hidrocortisona, 5 µg/mL transferrina, 0,1 nM toxina colérica, 2 ng/mL TGF- α , 1 ng/mL EGF e 5% de meio condicionado obtido a partir da cultura de fibroblastos primários em alta confluência por 48h, denominado como meio

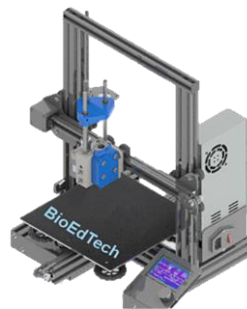
RAFT. Após 24 horas, os insertos foram transferidos para uma interface ar-líquido sobre um filtro celular de 100 µm em placas *Falcon® 6 Well Deep Well Plate* (Corning, Nova Iorque, EUA) por 10 dias. No 10º dia, as epidermes foram transferidas e mantidas em incubadora com baixa umidade (~50%) por 24 horas. O meio de cultura foi substituído a cada 2 dias. Todos os experimentos foram conduzidos a partir do 11º dia do modelo de epiderme.

3.3. Bioimpressão do equivalente epidérmico (B-RHE)

O desenvolvimento de um protocolo de bioimpressão do modelo de epiderme humana reconstruída foi confeccionado com a colaboração da Pós-Doutoranda Denisse Esther Mallaupoma Camarena.

As peles foram reconstruídas utilizando a bioimpressora modelo BioEnder da startup BioEdTech (Belo Horizonte, MG, Brasil), Figura 2. Esta bioimpressora com cabeçote único, trabalha com mecanismo de extrusão por pistões mecânicos e permite a deposição precisa de biotintas de baixas viscosidades, com resolução de movimento nos eixos X, Y e Z de 10 µm. Seringas descartáveis foram utilizadas para manter a esterilidade do método e acopladas a agulha de irrigação (25 × 0.7 mm, Injex, Ourinhos, SP, Brasil).

Figura 2. Bioimpressora modelo BioEnder da startup BioEdTech. Trabalha com mecanismo de microextrusão por pistões mecânicos para deposição precisa de soluções com baixa viscosidade.



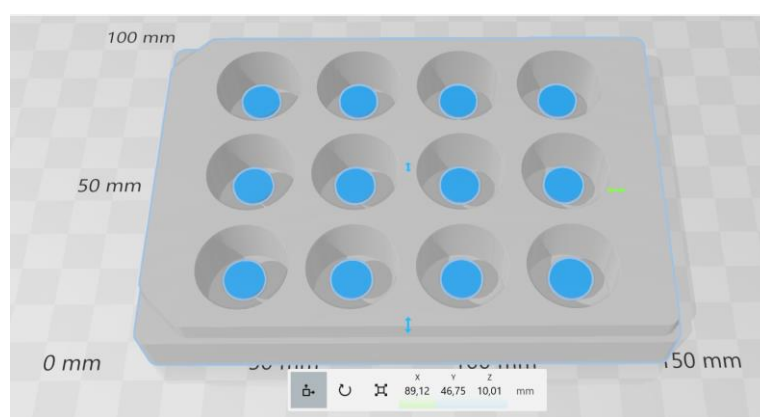
Fonte: BioEdTech. Disponível em: <https://www.bioedtech.com.br/bioimpressora>. Acesso em 20/10/2021.

3.3.1. Desenho tridimensional e código computacional da Bioimpressão de Epiderme

Inicialmente, para se estabelecer o desenho tridimensional, ou *computer-aided design* (CAD), a ser bioimpresso, se obteve o desenho de uma placa de 12 poços em formato .stl obtido pela plataforma de livre acesso GrabCad (GrabCad, disponível em:

<https://grabcad.com/library/twelve-12-well-culture-plate-1>, download realizado em 02/06/2021), como pode ser visualizado na Figura 3. A partir do desenho da placa de 12 poços para referência espacial, 12 cilindros com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura foram desenhados e dispostos à uma altura de 0,5 mm da base da bioimpressora (em azul, Figura 3), pelo programa 3D Builder (Microsoft Corporation, EUA). As medidas descritas serão utilizadas para a bioimpressão em uma placa de 12 poços contendo insertos permeáveis (*transwell*).

Figura 3. Desenho tridimensional da bioimpressão no programa 3D Builder (Microsoft).



Fonte: foto de tela do programa 3D Builder (Microsoft), elaborado pela autora.

Apenas os cilindros em azul foram usados na etapa seguinte, onde o CAD foi enviado ao programa de fatiamento 3D denominado PrusaSlicer (Prusa Research, Praga, República Tcheca), que faz a conversão do desenho tridimensional na programação da bioimpressora. Assim, a partir das coordenadas espaciais do desenho 3D e pela definição de parâmetros da bioimpressão como velocidade e força aplicada para a extrusão e movimento, número de camadas, porcentagem de preenchimento e diâmetro do filamento, obtemos o código-fonte em formato “.gcode”, base da bioimpressão. Ajustes manuais no código para alterar coordenadas da altura (eixo Z) da bioimpressão foram necessários para ajustar a impressão aos poços da placa de cultura.

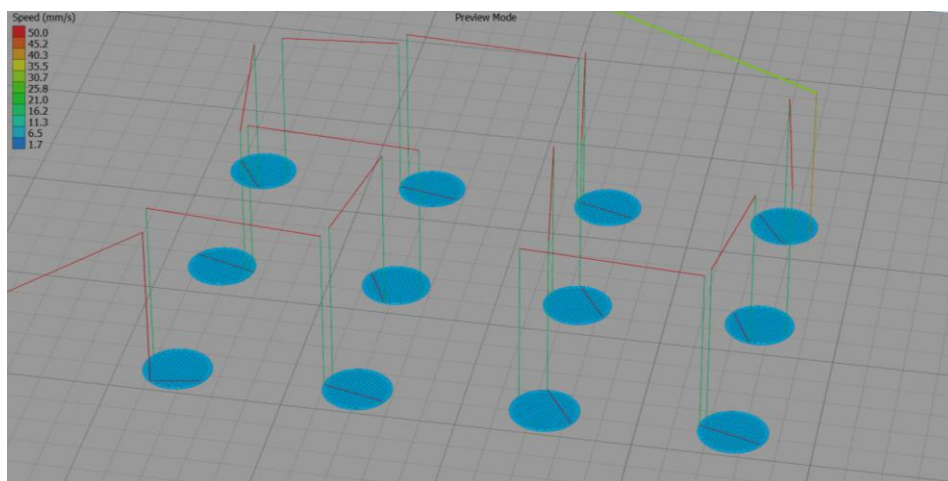
Tabela 1. Parâmetros da bioimpressão alterados dos padrões iniciais do programa PrusaSlicer.

Parâmetro	Ajuste
Altura da camada	0,5mm
Concha vertical – perímetro	1

Densidade de preenchimento	80%
Padrão de preenchimento	Retilinear
Velocidade de movimento durante a bioimpressão	5 mm/s
Multiplicador de extrusão	0,1

A partir da programação *gcode* obtida, outro programa de fatiamento denominado Simplify3D faz a comunicação com a bioimpressora BioEnder e realiza a bioimpressão.

Figura 4. Programação em modo de pré-visualização com a rota da bioimpressão no programa Simplify3D.



Fonte: foto de tela do programa Simplify3D, elaborado pela autora.

3.3.2. Bioimpressão de equivalente epidérmico

Os equivalentes epidérmicos bioimpressos seguiram o protocolo definido anteriormente para a reconstrução da epiderme manual, com algumas modificações. Inicialmente, foi feita a impressão de uma camada de 80 μ l colágeno IV (2 mg/ml) em DMEM, adicionada a seringas estéreis de 10 ml. O programa utilizado foi denominado “12p Colágeno Epiderme 80 ul.gcode”, baseado em uma camada de 0,7 mm e 1 cm de diâmetro circulares, ajustadas ao tamanho do inserto (Corning *Transwell*® - Corning). Após 2 horas de reticulação do colágeno, $2,5 \times 10^5$ queratinócitos humanos primários foram ressuspensos em meio KGM:RAFT (1:1) e adicionados em seringas estéreis de 10 ml. O programa de bioimpressão denominado “12 poços Epiderme 630ul.gcode”, ajustado para a impressão de uma camada de 0,7 mm de espessura e 1 cm de diâmetro circular, foi selecionado e 630 μ l da suspensão celular foram depositadas sobre a matriz

de colágeno. Após 24 horas incubadas a 37°C, as epidermes foram transferidas para uma interface ar-líquido em placas de cultura *deep well* (Falcon® 6 Deep Well – Corning) e mantidas com meio RAFT, como descrito anteriormente, por 11 dias para a diferenciação da epiderme em incubadora a 37°C, a 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído a cada 2 dias. Todos os experimentos foram conduzidos a partir do 11º dia do modelo de epiderme.

3.4. Ensaio de Irritação *In Vitro* em Modelo de Epiderme Reconstruída Humana (OECD, Guia nº 439)

Segundo o guia da OECD “*Guideline for the testing of chemicals, Test No.439 – In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods*”, o ensaio de irritação com modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) disponibiliza um procedimento *in vitro* para a identificação do perigo de substâncias irritantes de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da Organização das Nações Unidas (UN GHS) para substituir o teste de irritação *in vivo* que tipicamente utiliza animais de laboratório (OECD, 2021). Para a validação de modelos de epiderme humana reconstruída, a performance no teste deve ser comparável aos modelos validados de referência, e ser capaz de atingir a capacidade preditiva mínima das substâncias de referência em irritantes ou não-irritantes.

3.4.1. Caracterização morfológica e funcional das epidermes

Os equivalentes de epiderme foram fixados em formalina a 10%, em PBS, a 4°C por 1 hora, desidratadas em série crescente de concentração de álcoois e embebidas em parafina histológica. Os blocos de parafina contendo as amostras foram cortados em secções de 3 µm. Para analisar histologicamente a sua morfologia e diferenciação de camadas epidérmicas, as lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina.

A avaliação funcional da presença de marcadores de diferenciação nas epidermes foi feita por imunofluorescência em colaboração com o laboratório da Profa. Vanessa Morais Freitas e sua aluna Luciana Harumi, do Instituto de Ciências Biomédicas (USP). Para se obter a imunofluorescência, a recuperação antigênica das amostras foi realizada com tampão citrato 10mM pH6,0 em microondas por 20 minutos em potência média. Após o resfriamento, foi realizado o bloqueio inespecífico com soro de cabra 10% em PBS por 30 minutos, em temperatura ambiente. As amostras foram incubadas *overnight*

em geladeira (4° C) com os anticorpos primários para citoqueratina 10 (1:150 - CK10 – Ab 9025, Abcam), citoqueratina 14 (1:300 – CK14 – Ab 7800, Abcam), Involucrina (1:100 – Involucrin – Ab27495, Abcam) e Loricrina (1:150 – Loricrin – Ab85679, Abcam). Em sequência, foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (A11001, Invitrogen) ou Alexa Fluor 568 (A11011, Invitrogen). As lâminas foram montadas em meio de montagem *antifade* contendo DAPI (Thermo Scientific) para corar os núcleos celulares. As imagens de histologia foram obtidas a partir do microscópio óptico (Nikon Eclipse TS100) e a imunofluorescência por microscopia de fluorescência (Olympus BX63).

3.4.1.1. Teste de proliferação celular por imunofluorescência

Imunofluorescências para marcação de proliferação celular, via KI67, foram realizadas em amostras de RHE nas triplicatas biológicas (n = 3) foram analisadas neste estudo e observadas sob microscópio de fluorescência (Axioscópico 2, Zeiss). Um total de 10 a 12 imagens por amostra foram adquiridas com ampliação de 400 X usando o software ZEN (Zeiss). As células marcadas com Ki67 (verde) e o total (azul, marcadas com DAPI) foram contadas manualmente em cada imagem e o índice de proliferação foi calculado como a porcentagem de células marcadas com KI67 usando a seguinte fórmula:

Índice de proliferação = $(n^\circ \text{ de células KI67 positivas} / n^\circ \text{ do total células DAPI}) \times 100$
(La Rosa et al., 2021).

Todas as imagens foram analisadas por três observadores independentes para o cálculo final médio.

3.4.2. Avaliação da função barreira da epiderme humana reconstruída bioimpressa

Para a utilização dos modelos de RHE, o Guia da OECD nº 439 descreve a prévia validação da função barreira dos modelos de epiderme humana reconstruídas para garantir a qualidade do estrato córneo e de sua composição lipídica em resistir a penetração de agentes citotóxicos. A função barreira deve ser determinada pela concentração em que os produtos de referência, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), reduzem a viabilidade dos tecidos em 50% (IC50), após 18 horas de exposição. A viabilidade celular no modelo de epiderme reconstruída foi medida pelo ensaio colorimétrico a partir da redução enzimática mitocondrial nas células metabolicamente ativas (viáveis) do corante em sal de tetrazólio, ou MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-

2-il)-2,5-difeniltetrazolio] em formazam, de cor roxa, que foi quantificado por espectrofotometria.

As soluções de SDS foram feitas de acordo com as seguintes concentrações em série (Pedrosa et al., 2017): 0; 1,25; 2,5; 5 mg/ml em água destilada. Após avaliar a superfície dos modelos de pele humana, 30 μ l das respectivas soluções de SDS foram aplicados nas peles, em triplicata, e os tecidos foram mantidos por 18h em incubadora. Uma malha fina de poliamida foi adicionada para a melhor dispersão da solução. A solução de 0 mg/ml de SDS foi considerada o controle negativo.

Os tecidos foram lavados 20x com 1ml de PBS, e incubados com 600 μ L de MTT (1 mg/mL) a 37 ° C em incubadora de CO₂ a 5% por 3 horas. Após incubação, o excesso de MTT foi removido por 3 lavagens com PBS. O tecido, separado do inserto por auxílio de um bisturi, foi transferido para uma placa de 12 poços com 2 ml de isopropanol. A placa foi vedada com papel alumínio, e agitada circularmente por 2 horas (120 rpm). Após homogeneizar a solução, alíquotas de 200 μ l em triplicata foram transferidas para placa de 96 poços junto ao branco (isopropanol puro) e avaliadas pelo espectrofotômetro Synergy HT- Biotek Multiplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, EUA), leitura a 570nm.

A partir dos valores de densidade óptica obtidos (absorbância), a viabilidade relativa (%) foi determinada pela comparação entre a média do tratamento com a média do controle negativo: Viabilidade (%) = $100 \times (\text{Abs (amostra)}/\text{Abs (controle negativo)})$. Para a obtenção dos valores do IC₅₀, os valores de viabilidade (y) e concentração (x) foram adicionados em um gráfico de dispersão, e uma curva linear é interpolada para o cálculo do IC₅₀.

Assim, para a comparação da função barreira entre os modelos miméticos de epiderme humana pelos métodos manual e bioimpresso, três ensaios independentes foram realizados em diferentes momentos com queratinócitos oriundos de diferentes pacientes. A cada ensaio, foi usada uma amostra de 32 epidermes, totalizando 96 epidermes nos três ensaios. O tamanho amostral foi determinado pela comparação das duas metodologias (Bioimpressa e Manual), ao qual a cada uma das quatro concentrações de SDS (Tratamento) foram utilizadas três epidermes para a obtenção de uma triplicata experimental.

3.4.3. Ensaio de Irritação In Vitro em Modelo de Epiderme Reconstruída Humana (OECD, Guia nº 439)

O ensaio de irritação *in vitro* seguindo o Guia OECD nº 439 foi usado para avaliar o modelo de epiderme reconstruída bioimpresso em comparação com o modelo de epiderme seguindo os métodos manuais. Segundo o Guia da OECD nº 439, a irritação cutânea se refere ao dano reversível que ocorre na pele após a exposição às substâncias químicas. Assim, o princípio do método avalia a viabilidade celular após recuperação por 42 horas após a exposição das epidermes por 15 minutos com as substâncias categorizadas em irritantes e não irritantes usando o ensaio colorimétrico com MTT, como descrito anteriormente. Substâncias químicas consideradas irritantes reduzem a viabilidade celular a valores menores que 50%, enquanto as não-irritantes > 50% de viabilidade.

As epidermes foram transferidas para uma placa de 12 poços e as substâncias descritas na Tabela 2 foram aplicadas na superfície do tecido a um volume de 30 ul para substâncias líquidas ou 30 mg para substâncias sólidas (umedecidas com 25ul de água destilada), por um tempo de exposição de 20 minutos. Dentre as substâncias aplicadas, o PBS foi usado como controle negativo e SDS a 5% em PBS foi usado como controle positivo. Após a exposição, as epidermes foram lavadas 20 vezes com PBS e mantidas em incubadora por 42 horas com meio 1 ml de RAFT em placas de 6 poços, a 37°C e 5% de CO₂, para sua recuperação. Então, o ensaio de viabilidade foi iniciado ao incubar as epidermes em 600 ul de MTT (1mg/ml) por 3 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o excesso de MTT foi removido por 3 lavagens com PBS e as epidermes foram transferidas para uma placa de 12 poços com 2 ml de isopropanol (P.A.) sob agitação por 2 horas. Após homogeneizar a solução, alíquotas de 200ul em triplicata foram transferidas para placa de ELISA junto ao branco (isopropanol) e avaliadas pelo espectrofotômetro Synergy HT- Biotek Multiplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT – Estados Unidos), leitura a 570nm.

A partir dos valores de densidade óptica obtidos (absorbância), a viabilidade relativa (%) foi determinada pela comparação entre a média do tratamento com a média do controle negativo: Viabilidade (%) = $100 \times (\text{Abs}(\text{amostra}) / \text{Abs}(\text{controle negativo}))$.

Tabela 2. Substâncias de proficiência descritas no Guia OECD 439.

Substâncias	Nº CAS	Estado	Categoria Escore De Irritação <i>In Vivo</i> UN GHS ¹
PBS Estéril	31282-04-9	Líquido	Não irritante
SDS 5%	151-21-3	Líquido	Irritante
Ácido naftalenacético	86-87-3	Sólido	Não irritante
Estearato de Metila	112-61-8	Sólido	Não irritante
Hidróxido de Potássio (5% aq.)	1310-58-3	Líquido	Irritante
1-bromoetano	111-25-1	Líquido	Irritante
Aldeído Ciclâmico	103-95-7	Líquido	Irritante

Legenda: CAS - *Chemical Abstracts Service*.¹ – UN GHS – *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*, dispõe o escore de irritação *in vivo* representativo do teste de irritação de Draize (OECD *guideline* nº 404).² – No guia 439 (OECD) as substâncias irritantes intermediárias são categorizadas como não irritantes.

Para a comparação da performance no teste de irritação *in vitro* entre os modelos de epiderme humana com o método manual e bioimpresso, três ensaios independentes foram realizados com uma amostra em triplicata de epidermes, totalizando 108 epidermes.

3.4.4. Quantificação de interleucina 1 alfa (IL-1 α)

A IL-1 α foi quantificada a partir do sobrenadante de cultura de 24 h coletado após a exposição aos produtos químicos de referência usando kits comercialmente disponíveis de acordo com as instruções do fabricante por meio de um ensaio imunoenzimático padrão (ELISA Human IL-1 α Kit, R&D Systems, cat. nº DY200, EUA). Todas as medições foram realizadas em duplicata técnica para cada produto químico de referência aplicado à epiderme, em triplicata experimental. A densidade óptica em 450 nm das amostras foi determinada usando o leitor de microplacas Synergy™ HT (Biotek Instruments, EUA). O cálculo dos resultados foi realizado pela interpolação dos valores de densidade óptica a partir de uma curva linear padrão variando de 7,81 – 500 pg/mL, R²=0,98 (média) a partir de 3 leituras de placas individuais.

3.5. Influência do uso bioimpressora na viabilidade dos queratinócitos

A influência do uso da bioimpressora na viabilidade celular foi determinada pela curva de crescimento celular de queratinócitos em monocamada por 4 dias através do ensaio de azul de tripano e o ensaio de MTT. Além disso, foi quantificada a resposta inflamatória pela secreção de interleucina 1 alfa (IL-1 α) para comparar a influência da extrusão entre as metodologias bioimpressa e manual.

Culturas primárias de queratinócitos epidérmicos humanos foram coletadas e semeadas numa densidade celular de 2×10^4 células/poço em uma placa de cultura de 12 poços em triplicada usando pipetagem tradicional e os mesmos parâmetros de bioimpressão estabelecidos para a bioimpressão de RHE, descritos anteriormente.

Para o ensaio de curva de crescimento por azul de tripano, as células foram desaderidas dos poços com tripsina e contadas a cada dia por meio de contagem das células não coradas em azul (vivas) em câmara de Neubauer. As curvas de crescimento celular foram desenhadas a partir do número de células vivas durante 4 dias.

Para o ensaio usando MTT, a curva de absorbância, que demonstra a viabilidade celular, foi acompanhada durante 4 dias. O MTT dissolvido em DMEM (1 mg/mL, 300 μ L) e foi incubado no escuro, a 37 °C por 3h. Em seguida, a solução de MTT foi lavada com PBS e o formazam presente nas amostras foi extraído com isopropanol (P.A.), que foi mantido em agitação por 2 horas. Finalmente, de cada solução de formazam foram transferidas 200 μ L em triplicata para placas com 96 poços para leitura a 570 nm (SYLVESTER, 2011) com um leitor de placas (BioTek-Synergy HT). Os dados foram expressos como absorbâncias. As curvas foram desenhadas a partir das respostas obtidas durante 4 dias.

A quantificação da IL-1 α foi realizada a partir do sobrenadante das células nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a dispersão celular por pipetagem ou bioimpressão, usando um kit comercialmente disponíveis de acordo com as instruções do fabricante por meio de um ensaio imunoenzimático padrão (ELISA Human IL-1 α Kit, R&D Systems, cat. nº DY200, EUA). Todas as medições foram realizadas em triplicata para cada dia. A densidade óptica em 450 nm das amostras foi determinada usando o leitor de microplacas Synergy™ HT (Biotek Instruments, EUA). O cálculo dos resultados foi realizado pela interpolação dos valores de densidade óptica a partir de uma curva linear padrão variando de 7,81 – 500 pg/mL, $R^2=0,98$ (média).

3.6. Dispersão do número de células após ejeção de queratinócitos usando a bioimpressão

Para se avaliar se a dispersão celular por bioimpressão estava sendo homogênea, realizamos uma contagem do número de células por poço na placa de 12 poços, após a semeadura automatizada. Os queratinócitos epidérmicos humanos foram coletados e contados usando câmara de Neubauer e corante azul de tripano para atingir a concentração de $39,7 \times 10^4$ células viáveis/ml em meio de cultura ($2,5 \times 10^5$ células por poço). Assim que adicionadas à seringa, o programa de bioimpressão projetado anteriormente foi iniciado, dispersando 630 μ l em cada poço de uma placa de cultura de 12 poços, não contendo os insertos. Após o processo de bioimpressão, o volume disperso em cada um foi coletado para microtubos. Para evitar a tendência de fixação celular à placa de cultura, os poços foram lavados com 100 μ L de PBS e 200 μ L de tripsina foram adicionados por 4 min. Em seguida, os poços foram novamente lavados com 200 μ L de meio de cultura celular (DMEM 3:1 HAM), todos os volumes foram coletados. Como o volume final do tubo é de 1103 μ l, o número de células em cada poço foi determinado usando azul de tripano e câmara de Neubauer. Três experimentos individuais foram realizados, usando queratinócitos originários de três distintos pacientes.

3.7. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Em cada replicata, os produtos químicos de referência, controle negativo e controle positivo foram testados simultaneamente em três replicatas de tecido, replicata experimental. A comparação dos dados das metodologias manuais e bioimpressas foram analisadas usando o modelo linear generalizado de análise de variância (ANOVA), com teste de *post-hoc* de múltiplas comparações de Bonferroni. Além disso, os dois métodos foram comparados entre si usando um teste de hipóteses baseado na regressão logística pelo Qui-quadrado de Wald e verificação da interação, tendo a viabilidade como variável independente e a metodologia usada como variável dependente. Para ambos os testes de hipótese, o valor de $\alpha=0,05$. Para comparar as metodologias bioimpressas com as manuais dentro de cada produto químico de referência foram realizados testes t individuais, com alfa definido em 0,05 usando IBM® Software SPSS® Statistics (IBM Corporation®, EUA) e GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultura celular

4.1.1. Isolamento e cultura de células primárias epidérmicas e dérmicas

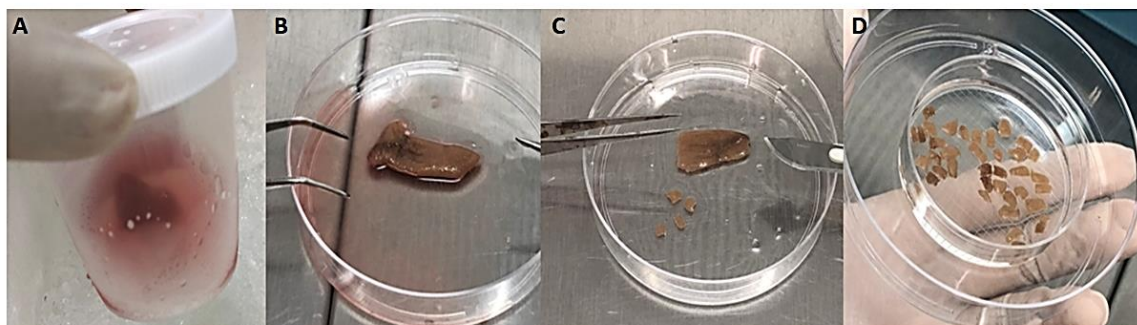
A partir de excedentes cirúrgicos de postectomia, 10 amostras de pele de prepúcio foram obtidas no primeiro ano. A partir destas amostras, as células epidérmicas e dérmicas foram isoladas, conforme informações da Tabela 3.

Tabela 3. Lista de pacientes doadores de pele para o isolamento de células primárias cutâneas.

Código	Idade	Data do isolamento
#130	13 anos	29/05/2019
#131	8 anos	16/10/2019
#132	3 anos	04/11/2019
#133	5 anos	11/12/2019
#134	2 anos	08/01/2020
#135	5 anos	15/01/2020
#136	7 anos	12/02/2020
#137	3 anos	12/02/2020
#138	16 anos	04/03/2020
#139	2 anos	04/03/2020

A sequência metodológica para o isolamento das células primárias foi descrito anteriormente nos métodos. A Figura 5 mostra como a amostra foi transportada ao laboratório em frasco descartável (A). Depois, esta foi esterilizada em álcool (B). Após limpeza dos tecidos conectivos e vasos esta foi fragmentada em pequenos pedaços (C) para permitir maior superfície de contato na digestão enzimática (D).

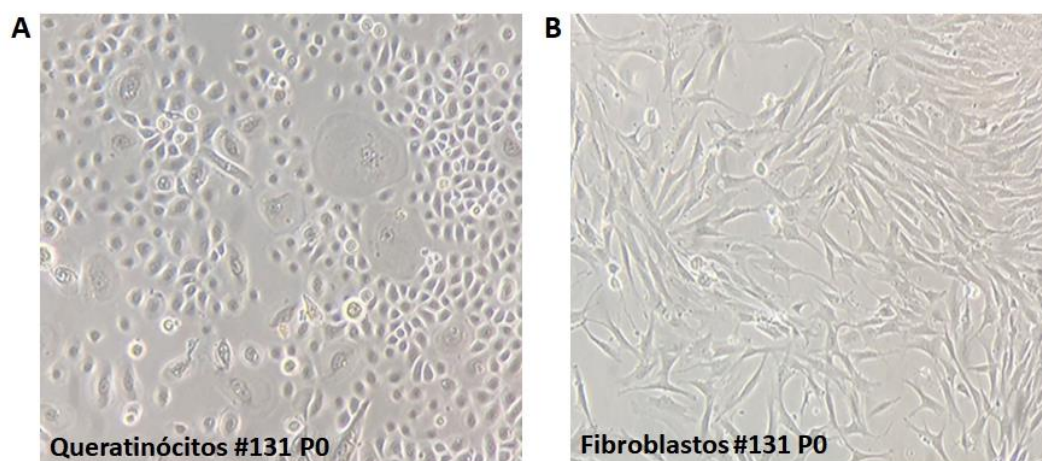
Figura 5. Etapas iniciais do isolamento de células cutâneas primárias a partir das amostras de postectomia.



Legenda: A) Amostra de excedente cirúrgico de postectomia em frasco descartável, em recipiente contendo gelo. B) Etapa de esterilização em álcool seguida de remoção dos tecidos conectivos e vasos. C) Fragmentação do tecido com uso de pinça e bisturi. D) Tecido fragmentado em solução enzimática.

A Figura 6, mostra a morfologia celular dos queratinócitos e fibroblastos primários resultantes do isolamento dessas células.

Figura 6. Imagem microscópica ilustrativa para apreciação da pureza das culturas, isto é, indicando que não há contaminação entre os dois tipos celulares (A) Queratinócitos (#131 P0) e (B) fibroblastos (#131 P0) isolados a partir das amostras de postectomia.



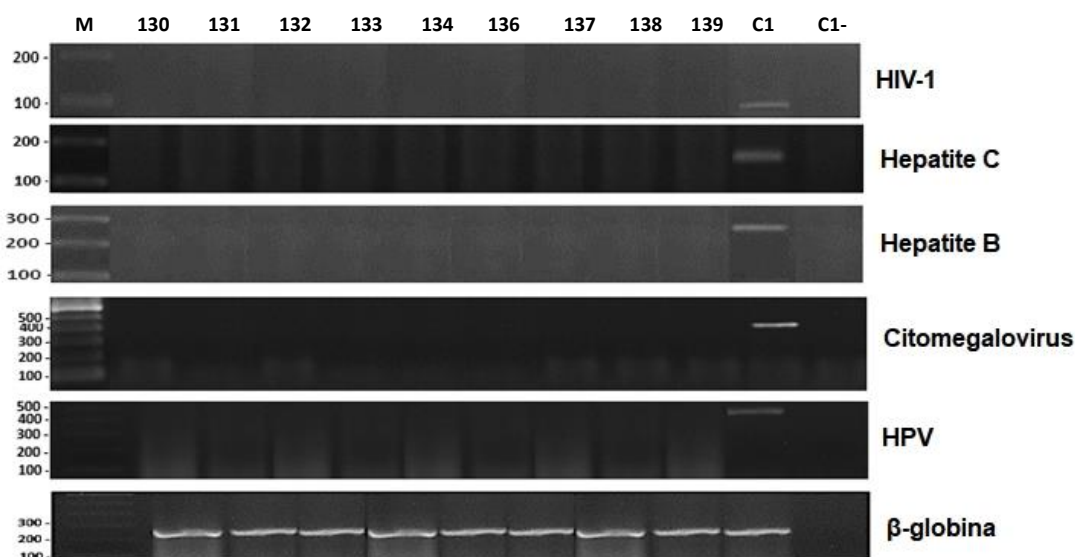
4.1.3. Controle de qualidade das células primárias

As células primárias isoladas a partir de amostras de prepúcio humano foram analisadas quanto a possíveis contaminações por agentes infecciosos, principalmente os

transmissíveis sexualmente, dado a origem da amostra. Isso é importante para garantir a pureza e qualidade das culturas, além de garantir a segurança ao pesquisador.

Para a avaliação das amostras quanto aos possíveis contaminantes, a extração do DNA e do RNA das células primárias da pele oriundas dos pacientes submetidos à cirurgia de postectomia #130, #131, #132, #133, #134, #136, #137, #138 e #139, foram realizadas em parceria com a Dra. Márcia Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá. Na figura 8, vemos os resultados destas análises por PCR-RT das amostras obtidas. Os microorganismos pesquisados (n = 12) foram: 1. Vírus: HPV, HSV-1, HSV-2, Citomegalovírus, Hepatite B, Hepatite C, HIV-1; 2. Bactérias: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium, Treponema pallidum; 3. Parasitas: Trichomonas vaginalis. A pesquisa resultou não haver contaminantes para todas as amostras testadas.

Figura 7. Análise eletroforética dos fragmentos de material genético amplificados oriundo das amostras de células isoladas das peles humanas para avaliação de presença de 5 diferentes microorganismos usando RT-PCR nos pacientes 130 a 139.



Legenda: M: marcador de tamanho molecular. B-globina (268 pb); C1-: controle negativo; C1+: controle positivo – controle positivo para HPV (450pb Citomegalovirus (435pb), Hepatite B (258pb), Hepatite C (188pb), HIV-1 (100pb);

Assim, todas as 9 amostras foram validadas quanto a sua qualidade e inocuidade quanto aos patógenos descritos (ANEXO 1).

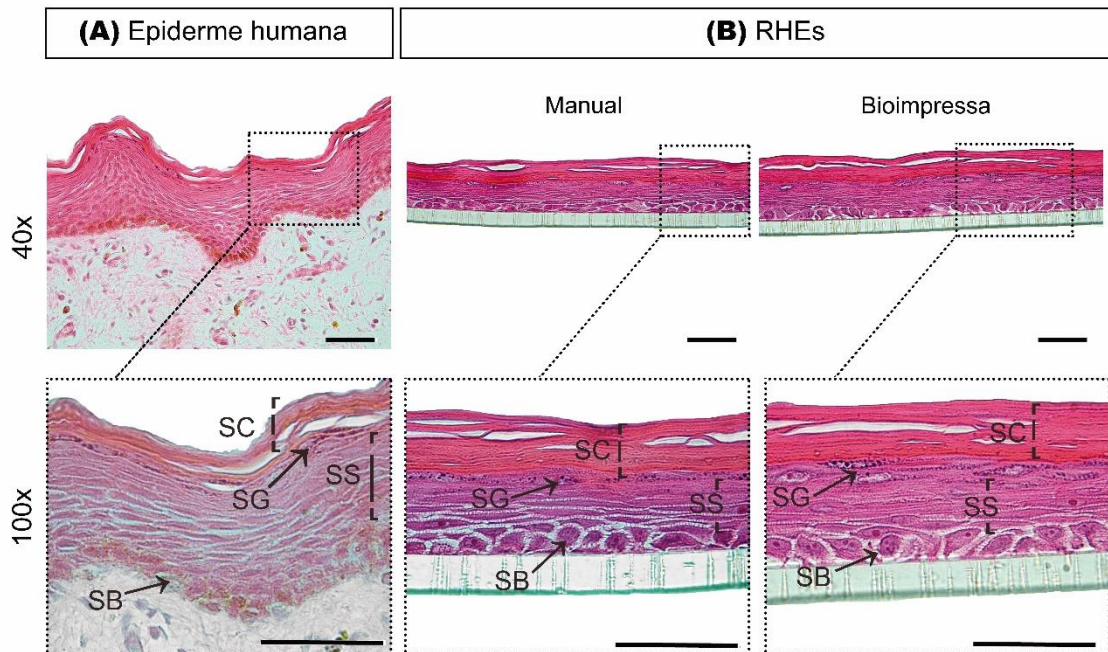
4.6. Bioimpressão de epiderme humana reconstruída

A etapa seguinte de ajustes das definições da bioimpressão no programa de fatiamento tridimensional representa a principal dificuldade existente na área atualmente, pois estes programas foram adaptados da impressão 3D clássica que utiliza o aquecimento de materiais plásticos em carretéis para a impressão (Pakhomova et al., 2020). Vários parâmetros exigidos nesses programas têm compatibilidade limitada com a bioimpressão. Assim, o volume dispersado na bioimpressão foi empírico, este foi medido e ajustado após a impressão de cada programação até atingir o volume necessário. Mesmo assim, os programas descritos para a bioimpressão de epiderme humana foram obtidos com sucesso com os volumes medidos por pipetas volumétricas, com 80 e 630 μ l.

4.8. Caracterização morfológica e funcional das epidermes manual e bioimpressa

Após a reconstrução de modelos de epiderme, a análise morfológica é importante para avaliar a diferenciação e estratificação celular dos queratinócitos compondo os diferentes estratos epidérmicos. Na Figura 8, se observam as histologias que comparam as morfologias entre uma biopsia de pele humana (Figura 8A) e os modelos de RHE reconstruídos, manual e bioimpresso (Figura 8B).

Figura 8. Análise histológica em seções verticais de parafina coradas com hematoxilina e eosina de (A) epiderme humana nativa e (B) comparação entre epiderme humana reconstruída (RHEs).

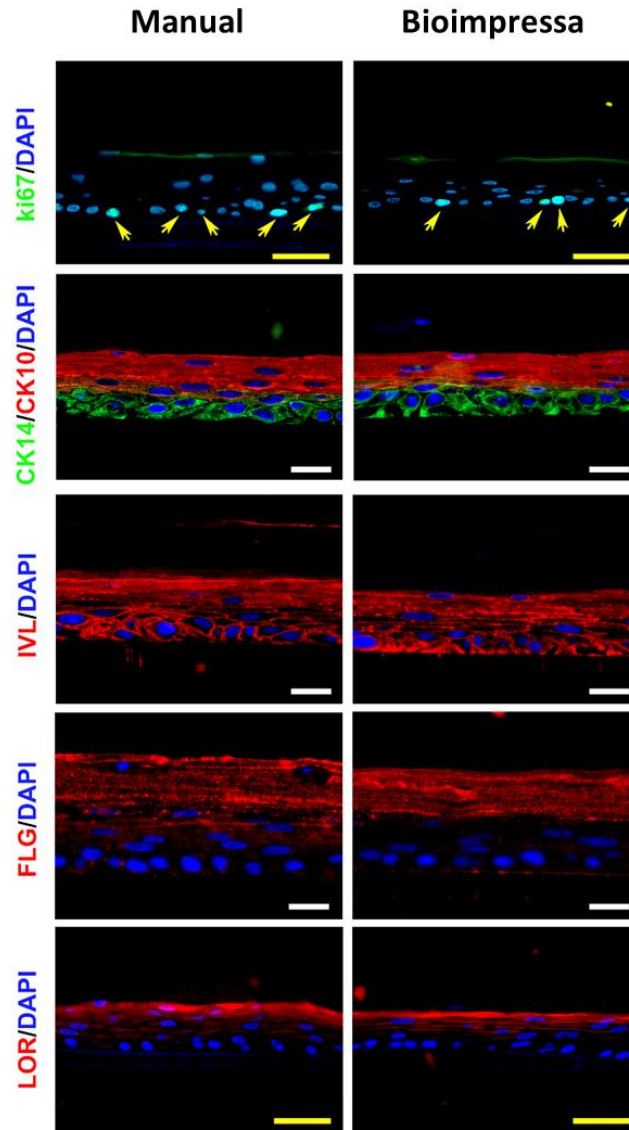


Legenda: (A) amostra humana e (B) RHEs reconstruídas. SC: estrato córneo, SG: estrato granuloso, SS: estrato espinhoso, SB: estrato basal. Barra de escala = 50 μ m. Ampliação = 40x e 100x.

Os modelos epidérmicos humanos reconstruídos desenvolvidos usando metodologias manuais e bioimpressas exibiram histologia e morfologia de alta qualidade ao apresentar diferenciação e estratificação dos queratinócitos, desde a camada basal à córnea, consistentes com os modelos epidérmicos validados representativos descritos pelo guia OECD TG 439 (OECD TG 439, 2021). Uma característica importante decorrente da maturação epidérmica é formação da camada córnea, responsável pela função barreira da pele. Os modelos epidérmicos exibiram epiderme bem diferenciada e com múltiplas camadas, contendo uma camada córnea viável. Além disso, ambas apresentaram na camada basal, células arredondadas com núcleo mais evidente que nas camadas suprabasais. A compactação esperada dos queratinócitos e a formação de grânulos de querato-hialina são visíveis nas camadas granulosa, anterior à camada córnea, que se apresenta anucleada e eosinofílica como esperado.

A imunofluorescência usa anticorpos específicos para garantir qualitativamente a correta estratificação da epiderme e formação da função barreira, devido a presença de proteínas de diferenciação terminal, visualizadas na Figura 9.

Figura 9. Imunofluorescência dos modelos de epiderme humana reconstruída bioimpressa e manual com marcação dos anticorpos de proliferação celular (Ki67), proteínas de estratificação (citoqueratina 10 e 14) e proteínas de diferenciação terminal (involucrina, loricrina e filagrina) em RHEs manuais e bioimpressos. Os núcleos são corados com DAPI. As setas amarelas indicam núcleos corados para ki67. Barra de escala amarela: 50 μ m. Barra de escala branca: 20 μ m.



Legenda: LOR – loricrina, FLG – filagrina, IVL-involucrina, CK-citoqueratina, Ki67-marcador de proliferação celular.

Como descrito por Van Den Bogaard *et al.* (2020), podemos verificar que os critérios esperados para os modelos RHE manual e bioimpresso foram atingidos: camada basal apresentou marcação apenas para citoqueratina 14 (CK14), enquanto as camadas suprabasais apresentaram citoqueratina 10 (CK10).

Além disso, as proteínas loricrina, involucrina e filagrina foram usadas como marcadores de diferenciação terminal, já que são essenciais para a formação da camada córnea. A partir da camada espinhosa, a proteína estrutural involucrina já começa a ser liberada na matriz extracelular, e assim que ela atinge a camada granulosa, esta é ligada a loricrina para formar o envelope corneificado presente na camada córnea, atingindo assim a diferenciação de queratinócitos a corneócitos (Baroni et al., 2012). Ambos os modelos de epiderme apresentaram involucrina nas camadas espinhosa e granulosa, loricrina na camada anterior ao estrato córneo e filagrina nas camadas suprabasais, demonstrando que a função barreira nestas estavam íntegras.

Como a permeabilidade da barreira cutânea é o resultado do processo de diferenciação dos queratinócitos, o qual é submetido a alterações bioquímicas e estruturais para a formação dos corneócitos em matriz extracelular rica em lipídeos (Baroni et al., 2012), a avaliação morfológica e funcional das características do modelo de epiderme reconstruída é fundamental para garantir a integridade da epiderme frente ao teste de irritação cutânea *in vitro*. Como resultado, as epidermes reconstruídas a partir dos métodos manual e bioimpresso apresentaram qualidade em seus parâmetros morfológicos epidérmicos e de maturação celular.

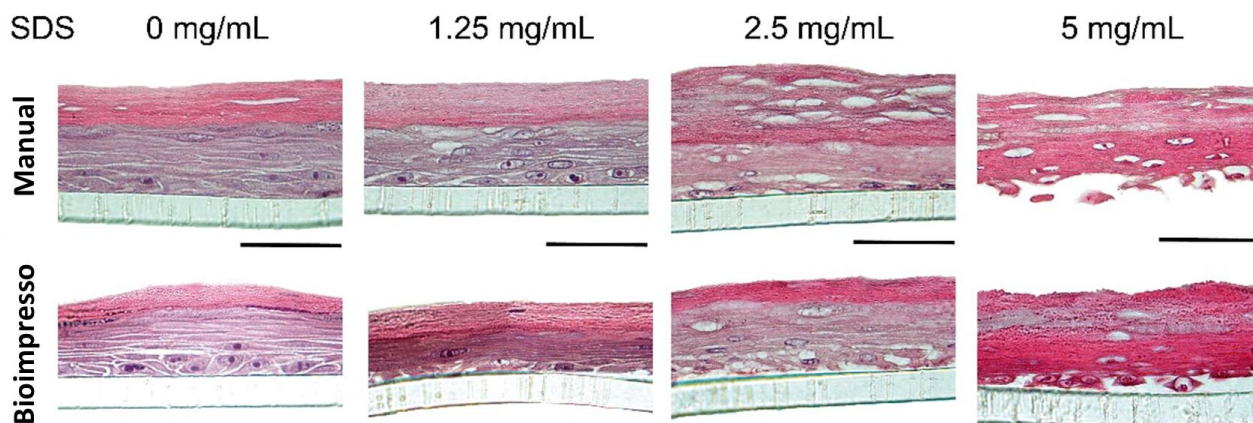
4.8. Avaliação da Função Barreira para o Ensaio de Irritação OECD 439

Para a validação do modelo de epiderme bioimpressa para ser usado como plataforma para o teste de irritação *in vitro*, conforme descritos no guia OECD 439, é necessária a avaliação prévia da função barreira do modelo mimético de pele.

A função barreira da epiderme é composta pela terminação diferencial do envelope córneo e ela determina a resposta citotóxica contra uma exposição à irritação química. Sabe-se que o estrato córneo deve conter multicamadas e perfil lipídico para exercer uma função barreira funcional para resistir a penetração de produtos químicos citotóxicos de referência como o sulfato dodecil de sódio (SDS) ou o Triton X (OECD, 2021; PEDROSA et al., 2017).

Assim, a função barreira foi avaliada ao determinar a concentração ao qual a solução de SDS reduz a viabilidade tecidual por 50% após 18 horas de exposição (IC50).

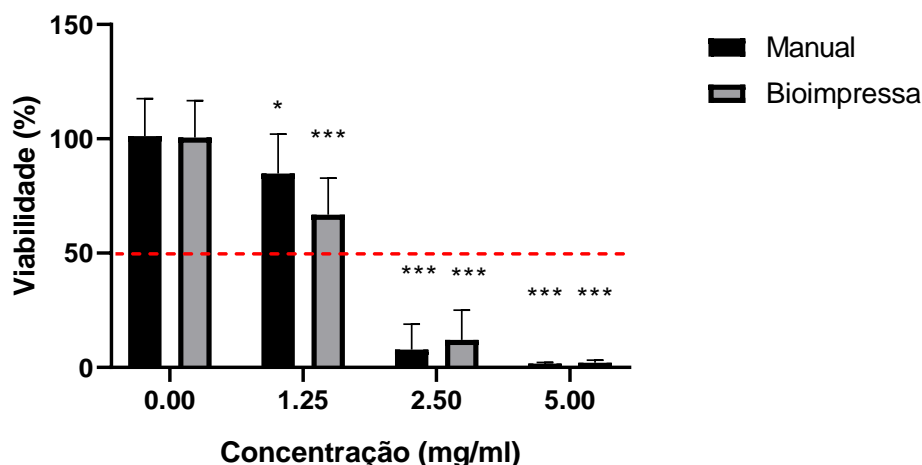
Figura 10. Caracterização histológica das epidermes bioimpressa e manual nas diferentes concentrações de SDS aplicadas no ensaio de função barreira, em microscópio óptico. Barra de escala = 50µm. Ampliação = 100x.



Como visto na Figura 10, as concentrações crescentes de SDS alteraram o estrato córneo, geraram a formação de núcleos apoptóticos, vacuolização citoplasmática, e de aumento da eosinofilia dos estratos intermediários (granuloso e espinhoso), características que demonstram evidente morte celular.

A viabilidade do modelo de epiderme de cada método se mostrou decrescente de maneira inversamente proporcional ao aumento da concentração de SDS aplicado. Pode-se verificar que a viabilidade das epidermes em ambos os métodos descritos é altamente relevante a partir da concentração de 1,25 mg/ml, demonstrando redução significativa na viabilidade celular nos dois métodos independentemente.

Figura 11. Avaliação da função barreira dos modelos de epiderme humana reconstruída por método manual e bioimpresso. A viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações de SDS (0; 1,25; 2,5 e 5 mg/ml) foi usada para a determinação da viabilidade de 50% (IC50) em três experimentos independentes (média e desvio padrão), usando MTT.



Legenda: comparação entre o controle negativo (0 mg/ml) e grupos tratados dentro de cada metodologia, por ANOVA: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; e, (***) $p < 0,001$. Linha vermelha tracejada – Viabilidade de 50% (IC50).

A partir do gráfico obtido, a concentração de SDS média que reduz a viabilidade dos tecidos em 50% após um tempo de exposição fixo de 18 horas (IC50) foi de 2,1 mg/ml para a epiderme bioimpressa e de 2,1 mg/ml para a epiderme manual. Assim, nenhuma diferença significativa na função barreira entre os modelos de epiderme foi encontrado.

Pela tabela 4, verificamos que os valores de IC50 as epidermes bioimpressa e manual estão dentro dos de referência encontrados no guia OECD 439 de todos os modelos de pele validados com o tratamento com SDS por 18 horas: EpiSkin™ (L’Oreal), IC50 = 1 – 3 mg/ml, LabCyte EPI-MODEL24 (Japan Tissue Engineering Co.), IC50 = 1,4 – 4 mg/ml, e KeraSkin (Biosolution Co.), IC50 = 1,5 – 4,8 mg/ml (OECD, 2021). Em relação à referência interna do laboratório o IC50 foi inferior ao obtido (2,1–3,5 mg/ml) publicado por Pedrosa e colaboradores (2017), isso pode ocorrer devido a variações de manipulação e metodologia, já que os modelos aqui descritos ficaram 1 dia a menos em incubadora.

Tabela 4. Comparação entre a função barreira do modelo RHE bioimpresso e manual em com os modelos validados para irritação cutânea descritos no guia OECD nº 439.

IC50 - 18H DE TRATAMENTO COM SDS (LIMITE INFERIOR – LIMITE SUPERIOR)	
EPISKIN™ (SM)	1,0 – 3,0 mg/ml
LABCYTE EPI-MODEL24 SIT	1,4 – 4 mg/ml

KERASKIN™ SIT	1,5 – 4,8 mg/ml
PEDROSA ET AL. (2017)*	2,1-3,4 mg/ml
EPIDERME BIOIMPRESSA*	1,7 – 2,4 mg/ml
EPIDERME MANUAL*	2,0 – 2,3 mg/ml

Legenda: * modelos internos do laboratório de Fisiopatologia da Pele.

A partir da comparação entre as duas metodologias pelo teste de hipóteses por regressões múltiplas, verificamos que os dois modelos bioimpresso e manual não apresentam diferença significativas na viabilidade celular no teste de função barreira, demonstrando que estes são equivalentes ($p=0,906$).

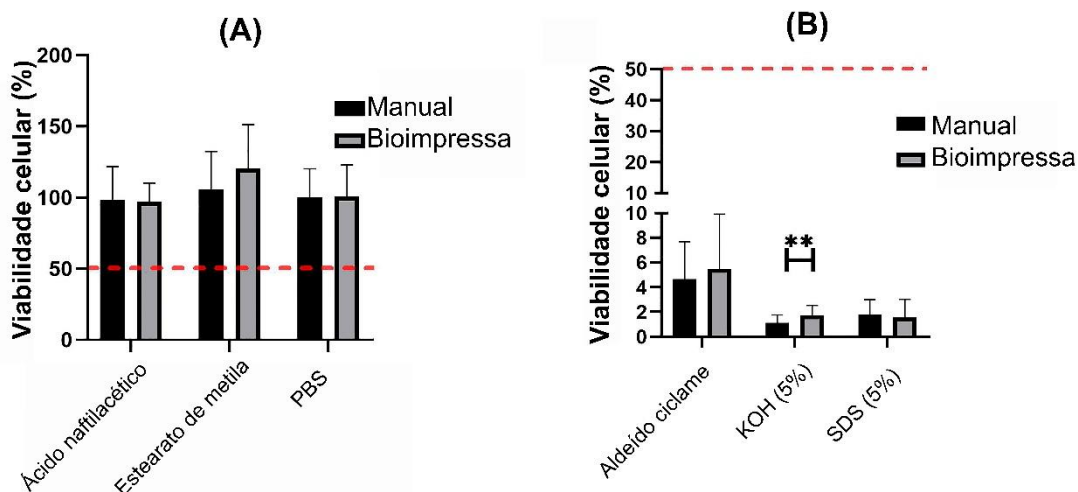
A tolerância a detergentes é um dos melhores métodos indicadores da integridade da função barreira da pele humana (Angelova-Fischer, 2016). A permeabilidade da função barreira é determinante para definir a resistência à permeação de substâncias irritantes. Portanto, os modelos RHE bioimpresso e manual demonstraram qualidade da função barreira ao obter valores de IC50 dentro dos valores dos modelos validados de referência descritos no guia OECD nº 439 (OECD, 2021), o que habilita o seu uso como modelo de epiderme humana reconstruída para o uso no ensaio de irritação *in vitro*.

4.9. Avaliação dos modelos de epiderme no teste de irritação *in vitro* OECD 439

A partir da demonstração morfológica equivalente entre a RHE manual e bioimpressa e da validação da função barreira destes miméticos conforme os modelos de referência validados descritos no guia OECD 439, prosseguiu-se para a etapa final de avaliação destes modelos para constituir uma plataforma de avaliação de segurança frente ao teste de irritação cutânea *in vitro*.

Para avaliar a resposta do RHE às substâncias de referência, conforme sugerido pelo TG 439, selecionamos ácido naftaleno acético e estearato de metila como não irritantes (UN GHS No Category) e aldeído ciclâmico e hidróxido de potássio 5% como irritantes (UN GHS Categoria 2). Junto aos controles positivo (SDS 5%) e ao controle negativo (PBS), as substâncias foram aplicadas sobre os modelos de epiderme para comparação de suas performances no teste de irritação *in vitro*.

Figura 12. Avaliação in vitro da irritação cutânea a 6 substâncias de referência (a) não irritantes e (b) irritantes de acordo com teste de irritação descrito na OCDE GD 439. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.



Legenda: (**) $p < 0,01$ quando comparado à mesma substância teste t (manual x bioimpressa). KOH =Hidróxido de potássio; SDS = Dodecilsulfato de sódio. Barra vermelha pontilhada = limiar de 50% de viabilidade.

De acordo com a figura 12, ambos modelos de RHE discriminaram corretamente as substâncias de referência classificadas como irritantes ou não irritantes de acordo com o valor do limiar de viabilidade tecidual de 50% (OECD TG 439, 2021). Não foram observadas diferenças significativas entre as metodologias, exceto pela maior viabilidade do hidróxido de potássio aplicado ao RHE bioimpresso do que o RHE manual.

Como pode ser visualizada na Tabela 5, em comparação com as epidermes humanas validadas descritas no guia OECD 439, os modelos de epiderme bioimpressa e manual atingiram valores proporcionais de viabilidade celular.

Tabela 5. Comparação da viabilidade média dos modelos de RHE bioimpresso e manual e a classificação das substâncias de acordo com os métodos validados de referência do Guia OECD 439.

Substâncias de referência	Resultados incluídos no Guia OECD 439 (OECD, 2021) *						Resultados da pesquisa	
	EpiSkin™ (SM)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODE L 24	epiCS®	Skin+ ®	KeraSkin™ SIT	RHE Manual	RHE Bioimpressa

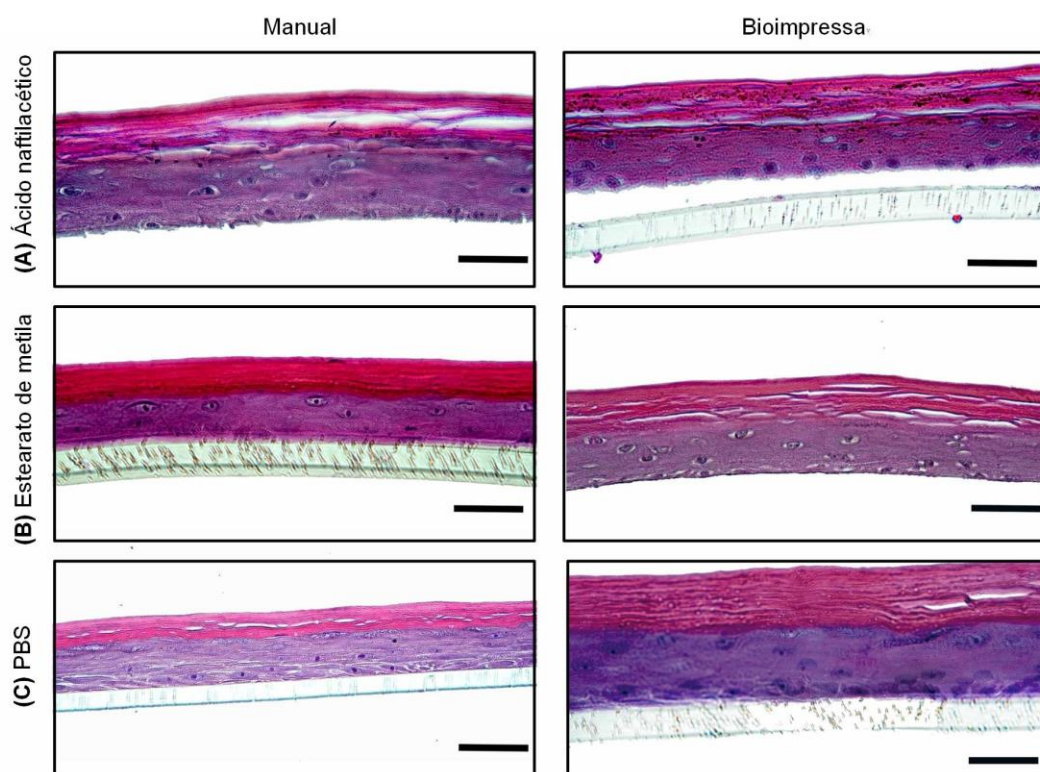
Substâncias não-irritantes								
Ácido naftaleno acético	92.3 ± 5.2	104.0 ± 12.9	100.4 ± 7.6	99.3 ± 10.4	94.6 ± 17.9	81.8 ± 15.0	98.2 ± 22.4	96.8 ± 12.9
Metil estearato	98.5 ± 11.3	104.4 ± 15.8	99.3 ± 10.4	101 ± 8.0	101.7 ± 6.5	93.4 ± 11.3	105.6 ± 24.1	120.4 ± 24.6
Substâncias irritantes								
Aldeído ciclâmico	25.4 ± 12.1	1.7 ± 0.9	9.1 ± 2.9	12.8 ± 26.4	3.0 ± 0.4	1.7 ± 3.0	4.6 ± 2.9	5.5 ± 4.2
Hidróxido de potássio (5% aq.)	9.3 ± 10.0	16.7 ± 17.0	3.3 ± 3.1	2.6 ± 3.6	5.2 ± 1.5	-1.2 ± 2.0	1.1 ± 0.6	1.7 ± 0.8

CAS - Chemical Abstracts Service. Escore definido a partir do limiar de viabilidade celular obtido a partir de um experimento independente, sendo > 50% não irritante e < 50% irritante (OECD 439, 2021).

Em complemento a Tabela 5, os valores médios de viabilidade do controle negativo (PBS) na RHE bioimpressa foi de 100,7% (desvio padrão de 20,8) e na RHE manual 100,1 % (desvio padrão de 19,3). Para o controle positivo (SDS 5%), a viabilidade média na RHE bioimpressa foi de 1,5% (desvio padrão de 1,4) e na RHE manual 1,8% (desvio padrão de 1,1%).

A avaliação da organização estrutural dos modelos RHEs foi acompanhada por análise histológica após aplicação das substâncias-teste. As RHEs submetidas a substâncias classificadas como não irritantes (Figura 13) apresentam morfologias equivalentes as RHEs submetidas a PBS (controle negativo), corroborando a resposta obtida pelo ensaio de viabilidade.

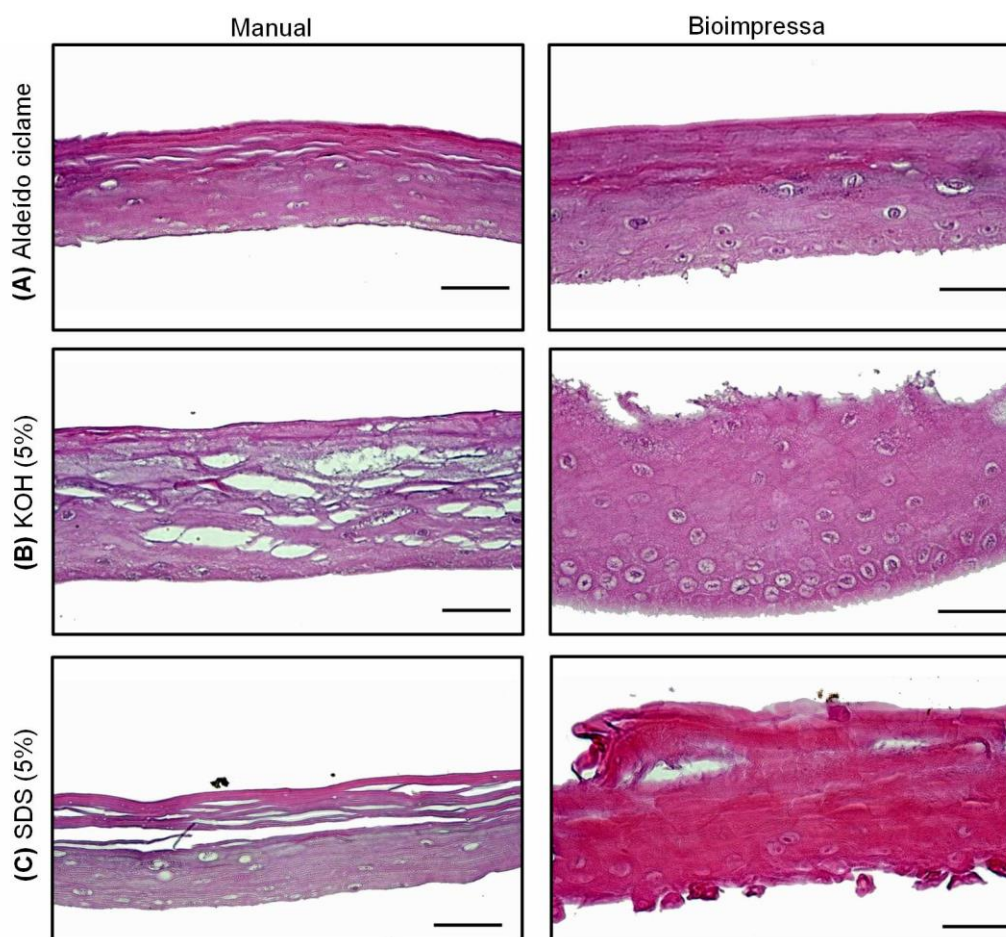
Figura 13. Análise histológica das RHEs após aplicação de substâncias não irritantes.



Legenda: Manual: RHE reconstruída por técnica manual, Bioimpressa: RHE construída usando bioimpressão. As substâncias usadas foram: (A) Ácido naftilacético, (B) Estearato de metila e (C) PBS: solução salina tamponada com fosfato (controle negativo). Ampliação = x40. Barra= 50 μ m.

Em contraste, a morfologia dos RHEs tratados com aldeído ciclame, KOH e SDS, apresentados na Figura 14, o dano irritativo induzido por substâncias de referência irritantes, revelaram presença de dano com maior comprometimento das RHEs bioimpressa tratadas com KOH e SDS.

Figura 14. Análise histológica das RHEs após aplicação de substâncias irritantes.



Legenda: Manual: RHE reconstruída por técnica manual, Bioimpressa: RHE construída usando bioimpressão. As substâncias usadas foram: (A) aldeído ciclame, (B) KOH (5%): solução de hidróxido de potássio e (C) SDS (5%): solução de dodecil sulfato de sódio (controle positivo). Ampliação = x40. Barra= 50 μ m.

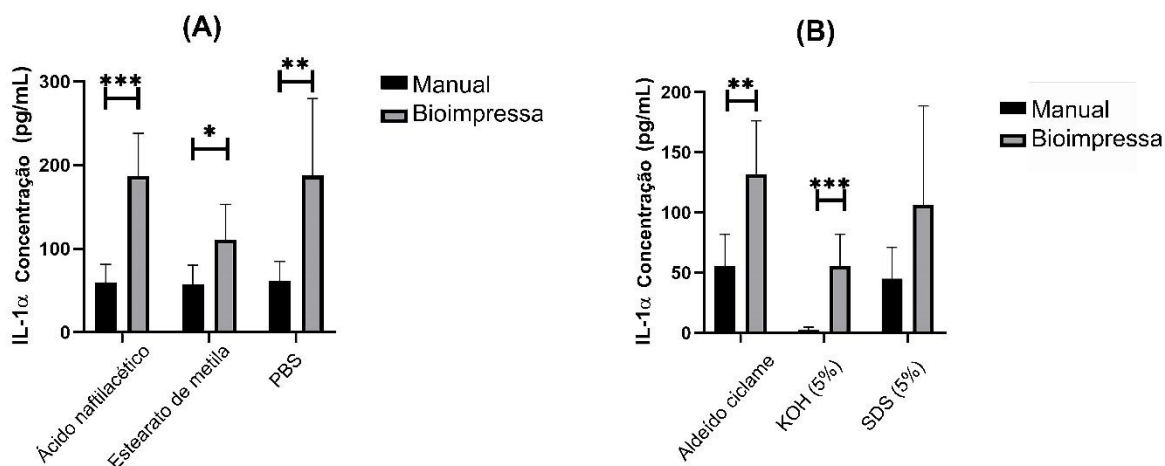
Assim, a transferência da metodologia manual para a tecnologia de bioimpressão estabeleceu ótimos modelos epidérmicos que são valiosos modelos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade de produtos químicos irritantes, pois ambos apresentaram morfologia correspondente, além de performance equivalentes na avaliação da função de barreira e testes de irritação.

4.9.1. Resposta inflamatória (IL-1 α) induzida por irritação química

O potencial de irritação da pele induzida por produtos químicos está envolvido com a ativação de uma resposta inflamatória, incluindo a liberação de mediadores inflamatórios, como a interleucina 1 alfa (IL-1 α) (FELDMEYER et al., 2010). Assim, as

concentrações de IL-1 α foram medidas na cultura sobrenadante 24 horas após a exposição às substâncias de referência usando o ensaio de imun absorção enzimática (ELISA).

Figura 15. Concentração de IL-1 alfa secretados a partir do sobrenadante da cultura após 24 horas a exposição às substâncias de referência no ensaio de irritação.



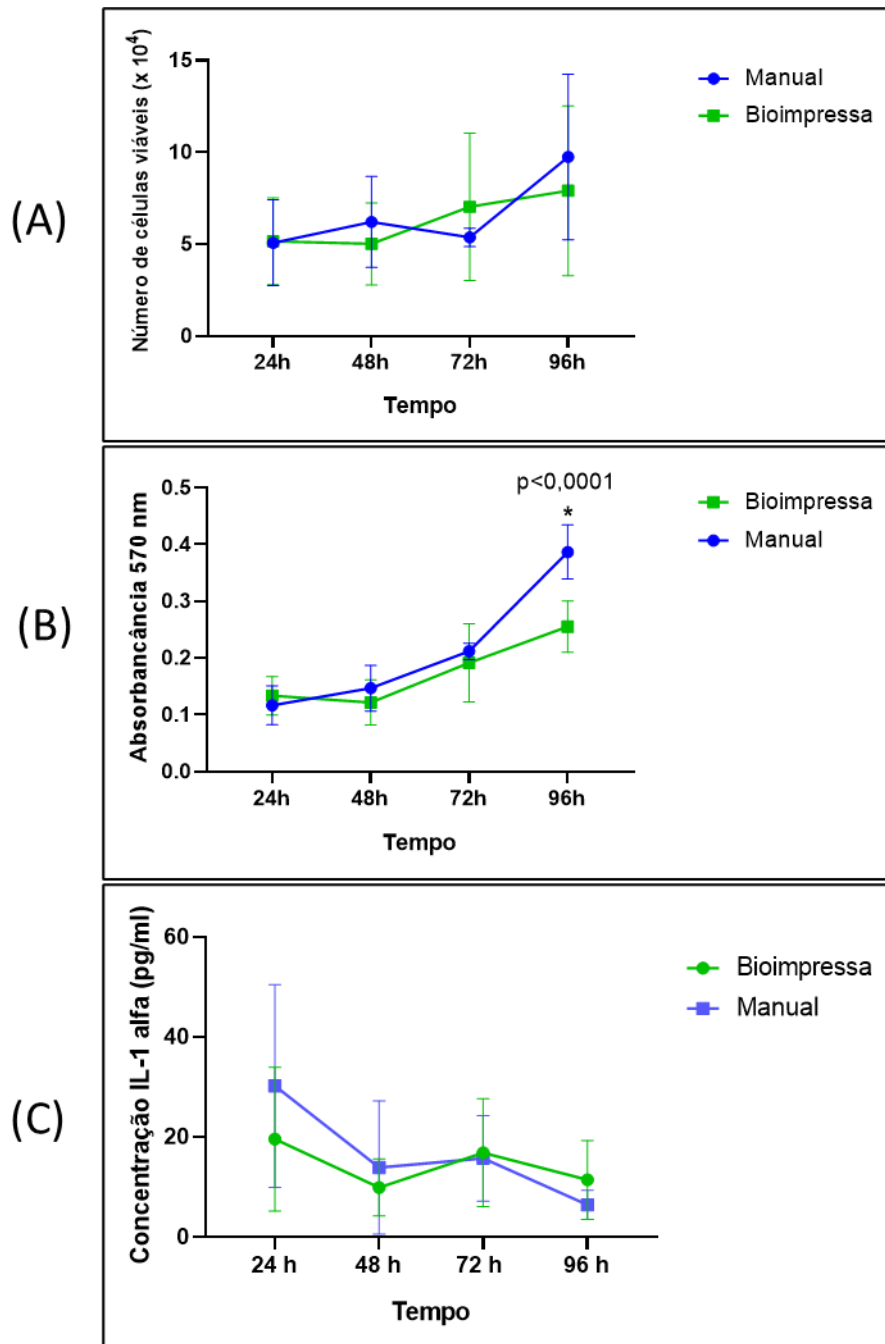
Legenda: Resultados expressos como a média com intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes. KOH = hidróxido de potássio; SDS = Dodecil sulfato de sódio. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos. ANOVA (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ ao comparar pele manual com pele bioimpressa.

Conforme mostrado na Figura 15, uma liberação significativamente maior de IL-1 α nos modelos RHE bioimpressos foi observada em cada uma das substâncias expostas, mesmo para o controle negativo (PBS). A diferença metodológica geral entre a liberação de IL-1 α usando técnicas manuais e de bioimpressão foi explícita (ANOVA $p < 0,0001$). Dessa forma, a metodologia de bioimpressão pode exacerbar a resposta inflamatória de modelos miméticos de pele bioimpressa nas condições metodológicas descritas.

4.10. Influência do uso bioimpressora na viabilidade dos queratinócitos

Após ser observada a maior liberação de IL-1 α decorrente do processo de bioimpressão, investigou-se a influência do processo de bioimpressão através da bioimpressão de queratinócitos em monocamada em uma curva de crescimento de 4 dias (96 horas) em comparação com o método manual que utiliza pipetas.

Figura 16. Avaliação dos queratinócitos após processo de bioimpressão em até 96h de incubação após semeadura por técnicas manuais e bioimpressão. (A) Curva de crescimento por azul de tripano, (B) Viabilidade celular determinada pela absorbância do metabólito do MTT extraído e (C) Quantificação da citocina inflamatória IL-1 alfa (pg/ml).



Legenda: Manual: RHE reconstruída por técnica manual, Bioimpressa: RHE reconstruída por bioimpressão.

A Figura 16A demonstra a curva de crescimento dos queratinócitos humanos em monocamada pela contagem do número de células utilizando o azul de tripano. Nas 96 horas de incubação pode-se observar um maior número de células proliferadas da técnica manual quando comparada com as células bioimpressa, porém devido principalmente ao

alto desvio padrão experimental, nenhuma diferença significativa entre os métodos foi observada.

A maior tendência no crescimento da curva para a técnica manual observada com a contagem com azul de tripano se complementa com o ensaio da viabilidade celular na construção da curva de crescimento utilizando o MTT (Figura 16 B). O ensaio por MTT demonstrou menor dispersão dos dados e com isso foi possível observar que ocorreu uma diferença significativa de viabilidade entre o crescimento das células no tempo de 96 horas usando o método tradicional de pipetagem, em comparação com a bioimpressão.

Além disso, investigou-se se a bioimpressão poderia ser responsável pela maior secreção de citocina inflamatória pelos queratinócitos pós-teste de irritação, que foi observado nos resultados dos modelos de RHE. A secreção de alta quantidade de IL-1 α logo após a extrusão das células foi avaliada, já que esta poderia ser responsável por gerar diferenças no crescimento celular e talvez, indiretamente, a maior sensibilidade nos testes de irritação nos modelos de epiderme reconstruídos. Porém, como observado na Figura 16C, não houve diferença significativa na secreção de IL-1 α entre as metodologias manual e bioimpressa dispersas em monocamada.

Portanto, a diferença na secreção de IL-1 alfa após os tratamentos irritativos nos modelos RHE foi atribuída ao resultado das diferentes taxas de crescimento dentro das metodologias, como demonstrado pela maior viabilidade celular por MTT para a técnica manual em 96h da dispersão celular. Esta diferença pode ser consequência direta da tensão de cisalhamento dos diferentes sistemas de dispersão, que podem levar a uma função de barreira aprimorada e a um estrato córneo mais denso. Portanto, as diferenças significativas na resposta inflamação induzida por produtos químicos observadas comparando bioimpressão e métodos manuais de dispersão celular pode ser correlacionado com o aumento da proliferação celular usando a metodologia manual como o bioimpressão com o uso de uma agulha de irrigação com as dimensões de 25 x 0,7 mm provavelmente causa maior tensão de cisalhamento mesmo para biotinta líquida.

4.11. Proliferação celular por imunofluorescência

Para estudar a diferença dos métodos em relação a proliferação celular, o KI67 foi usado como marcador em amostras de epidermes manual e bioimpressa. Na tabela 6, são apresentados os resultados reportados por cada observador para cada replicata biológica (n=3) e entre as técnicas (Manual e Bioimpressa). Os resultados foram expressos como

DAPI, que marca os núcleos celulares e representa o número de total de células, o KI67 para células proliferativas e o índice proliferativo (IP), em porcentagem.

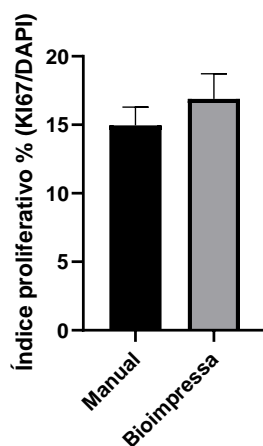
Tabela 6. Número de células marcadas totais (DAPI), células proliferativas (KI67) e índice de proliferação (IP) de três avaliadores independentes comparando as peles manuais e bioimpressas.

RHE Método	N	Observador 1			Observador 2			Observador 3		
		DAPI	Ki67	IP	DAPI	Ki67	IP	DAPI	Ki67	IP
Manual	1	512	68	13.3	486	69	14.2	419	66	15.8
	2	780	123	15.8	543	88	16.2	712	124	17.4
	3	626	85	13.6	546	74	13.6	539	80	14.8
Bioimpresso	1	414	74	17.9	398	70	17.6	364	67	18.4
	2	628	96	15.3	539	77	14.3	631	93	14.7
	3	381	71	18.6	382	65	17	352	64	18.2

Legendas: N: replicata biológica, DAPI: número total de células, Ki67: número de células proliferativas, IP: índice proliferativo (%).

De acordo com a figura 17, o índice proliferativo de RHE manual e bioimpresso foi avaliado com base na porcentagem de células de imunofluorescência marcadas para proliferação células (Ki67) em relação ao número total de células (DAPI) (média \pm desvio padrão). O índice proliferativo RHE bioimpresso (16,9% \pm 1,3) não apresenta diferenças significativas em relação ao manual metodologia (15,0% \pm 1,8) ($p=0,215$).

Figura 17. Índice proliferativo estipulado através do número de células proliferativas em relação ao número total de células, em porcentagem.



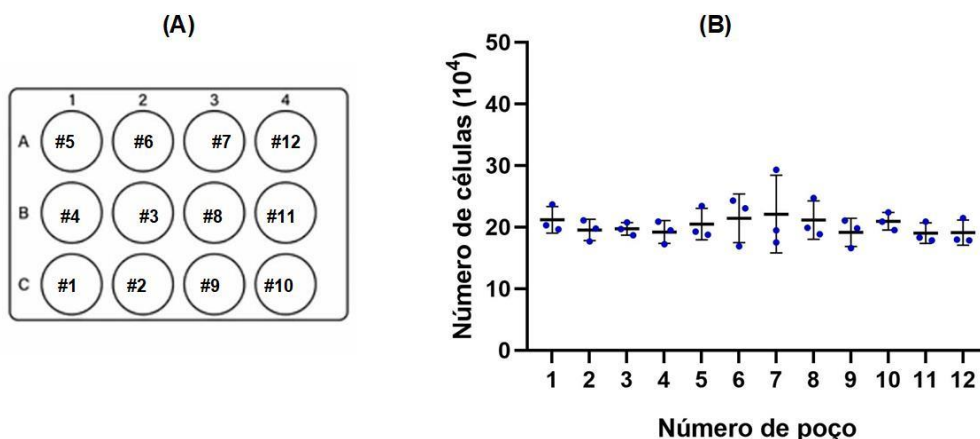
Legenda: DAPI: número total de células, Ki67: número de células proliferativas, IP: índice proliferativo (%).

4.12. Dispersão do número de células após ejeção de queratinócitos usando a bioimpressão

Após verificar a influência da extrusão da bioimpressora para a viabilidade celular, verificamos a dispersão celular do processo de bioimpressão, já que neste o efeito de sedimentação do tempo de bioimpressão sofrido pelas células a serem bioimpressas poderia resultar em diferentes quantidades e viabilidade celular.

Os queratinócitos foram bioimpressos em placa de 12 poços seguindo a ordem enumerada na Figura 17A e na Figura 17B, assim, observou-se a distribuição de número de células viáveis por poço. As células foram contadas logo após terminada a bioimpressão. O número de células viáveis foi aproximadamente 5×10^4 células menor do que o número de células viáveis previamente estabelecido por poço para a bioimpressão. Esta resposta pode ser justificada pelo estresse celular no momento da impressão, sendo concordante ao descrito na literatura. Wahlberg e colaboradores (2018) demonstraram a diferença na presença de células apoptóticas em células neuronais semeadas por técnicas manuais em comparação com a influência do uso de três tipos de agulha no sistema seringa agulha para ejeções celulares (Wahlberg et al., 2018).

Figura 18. Contagem de células viáveis por azul de tripano após bioimpressão em placa de 12 poços.



Legenda: (A) Número do poço segundo a ordem programação da bioimpressora, (B) Número de células viáveis após bioimpressão (por poço).

Para avaliar se a diferença entre o número de células em cada um dos 12 poços foi significativamente variável, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Assim, os

resultados demonstram que a dispersão das células nos poços de cultura foi precisa em torno da média de $20,3 \times 10^4$ células, sem diferenças significativas entre os poços ($p=0,8250$), também evidenciado por baixo coeficiente de variação, de 5,4%.

Portanto, usando a metodologia de bioimpressão descrita nesta pesquisa, garantimos que a sedimentação das células foi homogênea em todos os poços de cultura da placa de cultura de 12 poços.

5. DISCUSSÃO

Os modelos tridimensionais de epiderme humana reconstruída apresentando estratificação e outras características como a pele *in vivo* são conhecidas a quase 40 anos (Prunieras, Regnier e Woodley, 1983; Asselineau et al., 1986). Atualmente, estes miméticos de pele são amplamente utilizados em laboratórios de pesquisa acadêmica e na indústria farmacêutica, cosmética e química.

A nova tecnologia de bioimpressão tem grande potencial para aprimorar os miméticos de pele e automatizar sua construção. Porém, é primordial avaliar a tecnologia de bioimpressão frente a modelos já estabelecidos e que são reconhecidos para propósitos regulatórios, como para a avaliação da eficácia e segurança de cosméticos. De acordo com Kandorava e Hayden (2020), tecnologias de *open-source* e componentes comerciais para reconstruções de pele que sejam padronizados, mesmo em distintos laboratórios, poderão mudar significativamente o mercado de modelos de pele e permitir a aceitação regulatória de modelos *open-source* na próxima década. Este estudo estabeleceu um protocolo de bioimpressão adaptado de uma metodologia manual de epiderme humana reconstruída previamente validada por nosso grupo de pesquisa como plataforma para avaliação *in vitro* de irritação cutânea seguindo TG 439 (OECD, 2021).

Bioimpressão é uma tecnologia emergente promissora para permitir a engenharia de tecidos miméticos humanos de forma mais relevante (WENG et al., 2021). Dessa forma, utilizamos a tecnologia para verificar o desempenho de uma epiderme reconstruída bioimpressa para avaliação *in vitro* da irritação cutânea de produtos consumíveis tópicos. No entanto, comparações metodológicas com as técnicas tradicionais de pipetagem são escassas na literatura.

Conforme descrito nas diretrizes TG 439 da OCDE (2021): “*uma pele induzida por produtos químicos a irritação resulta de uma cascata de eventos que começa com a penetração dos produtos químicos através do estrato córneo, onde podem danificar as camadas subjacentes viáveis dos queratinócitos*”. Desta forma, a função barreira da camada córnea é fundamental para proteger a epiderme viável da penetração de produtos químicos irritantes, ou seja, a camada córnea determina a resposta fisiológica à exposição tópica. Portanto, o primeiro requisito para a qualidade de um modelo epidérmico é a avaliação da morfologia utilizando coloração H&E, seguida de análise de imunofluorescência para marcadores de estratificação, e por fim, a resposta da função barreira contra a exposição a um detergente irritante clássico (Boogard et al., 2021; OECD TG 439, 2021). Os resultados mostram que ambos os modelos epidérmicos apresentaram excelente morfologia, marcadores de estratificação e função barreira comparáveis às RHEs validadas de referência descritas na TG 439. Além disso, nossos modelos oferecem uma arquitetura histológica análoga à da pele humana, apresentando uma distinção clara entre cada camada epidérmica.

No teste de irritação cutânea, a epiderme bioimpressa distinguiu produtos químicos de referência pelo valor limite de 50% de viabilidade pelo ensaio MTT da mesma forma que nosso modelo epidérmico previamente validado (Pedrosa et al., 2017). Portanto, a transferência da metodologia manual para a tecnologia bioimpressa permitiu a construção de modelos epidérmicos de qualidade, que são valiosos modelos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade de produtos químicos irritantes. Ambas RHE apresentaram morfologia compatíveis, boa função barreira e foram qualificadas nos testes de irritação. Além disso, as RHE bioimpressa e manual apresentaram bom desempenho após aplicação de produtos químicos de referência, uma vez que a viabilidade dos tecidos apresentou valores comparáveis aos modelos epidérmicos validados descritos no teste 439 (TG 439, 2021).

A produção e liberação de interleucina 1 alfa (IL-1 α) a partir de queratinócitos epidérmicos é proporcional à exposição a produtos químicos irritantes e então é amplamente utilizada como um preditor de irritação química (Kidd et al., 2007).

No contexto do Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), os primeiros estudos de validação em modelos de pele reconstruída sugeriram que os métodos mais proeminentes para avaliar a irritação da pele *in vitro* foram a viabilidade celular (ensaio de redução de MTT) e quantificar IL-1 α (Faller et al., 2002). Sendo que, a concentração de IL-1 α seria usada como desfecho secundário. Assim, um

limiar de 60 pg/mL foi aplicado como modelo de predição para aumentar a sensibilidade da metodologia para determinar se uma substância foi classificada como irritante ou não irritante (Cotovio et al., 2005). No entanto, a liberação de citocinas foi altamente variável e alguns produtos químicos fortemente irritantes afetaram a geração da liberação de IL-1 α (Spielmann et al., 2007). Então, como as diretrizes da OCDE são continuamente atualizadas, o IL-1 α não é mais descrito como um parâmetro necessário para discriminar substâncias irritantes em modelos de pele in vitro.

No entanto, sua importância para a resposta à irritação é fundamental. IL-1 α é um mediador central da inflamação da pele e ativação da imunidade inata (Feldmeyer et al., 2010). Portanto, a IL-1 α proporcionou uma análise altamente sensível da resposta inflamatória nas epidermes manual e bioimpressa expostas a substâncias de referência. Após a exposição aos produtos químicos, menores concentrações de IL-1 α podem ser observadas nas substâncias irritantes, de forma proporcional à morte celular nas medidas de viabilidade pois após a irritação primária da pele, a IL-1 α não é liberada pelas células que morreram. Os resultados nos levaram a pensar que a liberação de citocinas apresentou uma resposta inédita na literatura, no qual a metodologia bioimpressa pode influenciar de forma negativa a resposta inflamatória. Esse resultado foi significativo para todas as substâncias aplicadas, mesmo para o controle negativo (PBS). Portanto, pode haver desvantagens metodológicas no uso da tecnologia de bioimpressora nas condições observadas neste estudo. No entanto, a diferença na secreção de IL-1 α não pode ser diretamente relacionada a um possível aumento do dano decorrente do processo de bioimpressão, já que após a extrusão das células, os miméticos epidérmicos foram cultivados em interface ar-líquido por 10 dias.

A bioimpressora utilizada para construir os modelos epidérmicos neste estudo, assim como muitas bioimpressoras de extrusão comercialmente disponíveis, funcionam pela extrusão mecânica aplicada ao êmbolo de agulhas descartáveis. Este sistema de dispersão é amplamente utilizado por suas vantagens, considerando a capacidade de manipulação asséptica da biotinta e a compatibilidade com uma grande variedade de viscosidades de biomateriais. No entanto, a bioimpressão baseada em extrusão pode gerar danos às células pela tensão de cisalhamento aplicado às células durante a força mecânica, uma propriedade que depende do diâmetro e comprimento da agulha, pressão aplicada e rigidez da biotinta (Cidonio et al., 2019; Paxton et al., 2017).

A tensão de cisalhamento é inevitável em qualquer processo de dispersão e deve ser considerada em todos os métodos de bioimpressão. Como método de dispersão, mesmo a pipetagem clássica apresenta tensão de cisalhamento. A tensão de cisalhamento não é exclusiva para soluções viscosas como os hidrogéis típicos usados em bioimpressão. Por exemplo, a influência da tensão de cisalhamento em meio líquido é altamente relevante para o cultivo de células em biorreatores (Wyma et al., 2018). Usando meio líquido, não podemos considerar a influência da rigidez do meio e outras características de hidrogéis que estão diretamente relacionadas às suas propriedades reticulantes, viscosidade e concentração. Mas para meios líquidos em métodos de bioimpressão, a tensão de cisalhamento é dependente da força de extrusão exercida nas células nas paredes do bico de extrusão, do diâmetro do bico de extrusão, a pressão com a qual as células foram impressas e o comprimento do bico de extrusão (Blaeser et al., 2016).

O efeito do diâmetro da agulha sobre o dano celular é controverso na literatura. Alguns autores afirmam que é significativamente menor que o efeito da pressão aplicada (Nair et al., 2009). Alguns autores afirmam que à medida que o diâmetro da agulha aumenta, mais danos são causados nas células (Ning et al., 2018). E, com mais evidências, alguns autores afirmam que à medida que o diâmetro da agulha aumenta, o dano celular diminui (Cidonio et al., 2019; Khalil & Sun, 2009; Li et al., 2011). A influência do diâmetro da agulha avaliada nos estudos anteriormente citados foi de no máximo 0,4 mm e mesmo em pressões mais altas ou sob alta tensão de cisalhamento, esse diâmetro de sistema de dispersão apresentou alta viabilidade celular (Li et al., 2011; Nair et al., 2009). No nosso estudo, embora não tenhamos conseguido medir a pressão aplicada à agulha de bioimpressão, esta poderia ser considerada um sistema de baixa pressão devido à viscosidade da biotinta, que é semelhante à da água (meio de cultura líquido KGM). Além disso, o diâmetro da agulha utilizado neste projeto (0,7 mm) é grande em comparação com os estudos relatados anteriormente e a bioimpressão foi realizada a uma velocidade de fluxo baixa e constante de 12,1 $\mu\text{L/s}$ para obter uma resolução de bioimpressão mais alta, com um tempo total de impressão de 52 s para cada poço da placa de cultura.

O índice de proliferação dos queratinócitos através do marcador KI67 em modelos epidérmicos foi investigado no último dia de cultura. Mas mesmo que não veja qualquer diferença na viabilidade celular após exposição química, morfologia e no índice proliferativo celular entre as metodologias manual e de bioimpressão, a tecnologia de

bioimpressão pode ter influenciado a resposta celular (Ramasamy et al., 2021). Na bioimpressão por extrusão, sabe-se que a tensão de cisalhamento aplicada sobre as células promove uma resposta de mecanotransdução. A transdução mecânica refere-se a mecanismos de detecção celular a alterações em sua arquitetura e resposta ao estresse mecânico, influenciando o metabolismo celular (Paluch et al., 2015). A resposta mecânica celular à tensão de cisalhamento pode alterar processos biológicos, como ativação de receptores citoplasmáticos, modulações na forma celular e alterações no crescimento, diferenciação ou morte celular (Stolberg & McCloskey, 2009). Assim, a tensão de cisalhamento desempenha papéis decisivos na biologia celular, na produção de proteínas (Zhan et al., 2020), sinalização e diferenciação celular (Yue et al., 2019). Por exemplo, sabe-se que para a diferenciação adequada de alguns tipos de células como mioblastos, condroblastos e osteoblastos, a tensão de cisalhamento influencia positivamente a construção organotípica (Datta et al., 2006; Yue et al., 2019).

Por outro lado, outros tipos de células podem ser afetados negativamente pela tensão de cisalhamento, principalmente quando mantidos em cultura *in vitro*. No trabalho de Ning *et al.* (2018), mesmo baixa tensão de cisalhamento apresentou um resultado adverso sobre a proliferação celular após 72 h. Blaeser e colegas, mostraram que a exposição de curto prazo a baixos níveis de cisalhamento não afetou a viabilidade celular imediatamente após a impressão, porém a longo prazo gerou alterações no potencial de proliferação das células, observadas em uma curva de crescimento (Blaeser et al., 2016). Em conformidade com esses resultados, obtivemos taxas de curva de crescimento de queratinócitos significativamente mais baixas em cultura em monocamada utilizando bioimpressora após 4 dias pelo teste de viabilidade com MTT, o que pode ser uma consequência direta da tensão de cisalhamento do sistema de agulhas cilíndricas usadas na bioimpressão. Outros autores também relataram que a baixa tensão de cisalhamento pode danificar as células e diminuir a viabilidade celular (Ramasamy et al., 2021).

Conforme discutido anteriormente para a biotinta líquida, a metodologia manual também submete as células a diferentes tensões, como hidrodinâmica e tensão de cisalhamento pela vazão. Mas o formato da ponteira tem um impacto significativo no dano celular, pois a estrutura é cônica. Sabe-se que o design cônico da ponteira causa pequenos danos às células, mesmo quando esse tipo de formato é aplicado à tecnologia de bioimpressão. Em comparação com o formato cilíndrico convencional das agulhas, o design cônico na extremidade de um sistema de distribuição, seja automático

(bioimpressora) ou conduzido manualmente, favorece a redução do dano celular (Ning et al., 2018; Li et al., 2011; Li et al., 2015). Para atingir a mesma taxa de fluxo de dispersão celular, as pontas cônicas requerem menor pressão quando comparadas às cilíndricas (agulhas). Portanto, o dano celular induzido pela tensão de cisalhamento é menor quando se utiliza pontas cônicas (Ning et al., 2018). Como a tecnologia de bioimpressão pode utilizar pontas cônicas adaptáveis para realizar a bioimpressão, esse formato pode ser favorável para não induzir respostas celulares alteradas a outros tipos de estressores, como o processo inflamatório irritativo induzido por produtos químicos aqui descrito. Embora seja relatado que a tensão de cisalhamento causada pela bioimpressão baseada em extrusão causa danos celulares dependendo dos parâmetros de impressão (Boularaoui et al., 2020), não observamos diferenças na viabilidade celular e morfologia dos modelos RHE bioimpressos e manuais. Além disso, o desempenho dos modelos epidérmicos bioimpressos foi alcançado para a metodologia de viabilidade recomendada para avaliar o teste de irritação cutânea *in vitro* (TG 439), uma vez que a correta classificação irritativa das substâncias foi realizada.

Portanto, a tecnologia de bioimpressão pode contribuir para a automação de metodologias conhecidas para reconstrução de modelos epidérmicos, fornecendo assistência significativa para as indústrias cosmética e farmacêutica realizarem testes *in vitro* confiáveis para avaliações de segurança de produtos tópicos consumíveis. No entanto, o perfil inflamatório desvantajoso da IL-1 α da metodologia bioimpressa em comparação com o método manual é uma novidade na literatura. Supõe-se que essa diferença na resposta inflamatória resulte dos diferentes formatos do sistema dispersante utilizado, que é favorável à ponta cônica, tradicionalmente utilizada na técnica manual com o uso de pipetas, ao qual não altera a taxa de crescimento celular a longo prazo.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, mesmo que as características morfológicas e as medidas de viabilidade utilizadas para avaliar a irritação *in vitro* do modelo epidérmico bioimpresso não sejam alteradas em comparação com a metodologia manual, o estresse mecânico inerente à tecnologia de extrusão que utiliza agulhas cilíndricas pode alterar indiretamente o perfil de resposta inflamatória pós-irritação química induzida em modelos epidérmicos bioimpressos por afetar o crescimento celular a longo prazo. Assim, como a tecnologia

de bioimpressão é amplamente utilizada em áreas da bioengenharia de tecidos humanos, como na reconstrução de modelos epidérmicos para avaliação de risco de produtos consumíveis, a influência dos sistemas de dispersão, entre agulhas ou ponteiros cônicas, utilizados nas metodologias de bioimpressão apresenta grande relevância.

7. BIBLIOGRAFIA

AKAZAWA, Y. et al. Adiponectin resides in mouse skin and upregulates hyaluronan synthesis in dermal fibroblasts. **Connective Tissue Research**, v. 52, n. 4, 2011.

BROHEM, C. A. et al. **Artificial skin in perspective: Concepts and applications**. **Pigment Cell and Melanoma Research**, 2011.

CAMARENA, D. E. M. et al. Development of Epidermal Equivalent from Electrospun Synthetic Polymers for In Vitro Irritation/Corrosion Testing. **Nanomaterials**, v. 10, n. 12, 16 dez. 2020.

CATARINO, C. M. et al. Skin corrosion test: a comparison between reconstructed human epidermis and full thickness skin models. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, p. 51–57, 1 abr. 2018.

CHOI, S. Y. et al. The effect of adiponectin on the regulation of filaggrin expression in normal human epidermal keratinocytes. **Annals of Dermatology**, v. 30, n. 6, 2018.

CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014. **Diário Oficial da União**, p. 9-, 2014.

CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016. **Diário Oficial da União**, p. 4- undefined, 2016.

CREPALDI, M. C. DE A. , P. P. C. , M.-E. S. S. , & B. S. B. DE M. **Toxicity evaluation of antiglycation compounds in glycated artificial skin**. Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences. **Anais...São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2013.

DE OLIVEIRA, É. A.; GODING, C. R.; MARIA-ENGLER, S. S. Tumor Models and Cancer Systems Biology for the Investigation of Anticancer Drugs and Resistance Development. Em: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l: s.n.]. v. 265.

DO NASCIMENTO PEDROSA, T. et al. Methyl- β -cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model. **Archives of Dermatological Research**, v. 309, n. 1, p. 63–69, 2017.

DO NASCIMENTO PEDROSA, T. et al. Skin Equivalent Models: Protocols for In Vitro Reconstruction for Dermal Toxicity Evaluation. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 2240.

EZURE, T.; AMANO, S. Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts. **BioFactors**, v. 31, n. 3–4, 2007.

- FELDMEYER, L. et al. **Interleukin-1, inflammasomes and the skin.** *European Journal of Cell Biology*, 2010.
- GARCIA, N. et al. Characterization of the barrier function in a reconstituted human epidermis cultivated in chemically defined medium. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, n. 1, 2002.
- GUERRERO-JUAREZ, C. F.; PLIKUS, M. V. **Emerging nonmetabolic functions of skin fat.** *Nature Reviews Endocrinology*, 2018.
- HARTUNG, T. **Toxicology for the twenty-first century.** *Nature*, 2009.
- HIEDA, D. S. et al. Air Particulate Matter Induces Skin Barrier Dysfunction and Water Transport Alteration on a Reconstructed Human Epidermis Model. **Journal of Investigative Dermatology**, 2020.
- HONG, S. P. et al. Adiponectin Enhances Human Keratinocyte Lipid Synthesis via SIRT1 and Nuclear Hormone Receptor Signaling. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 3, 2019.
- HU, Y. et al. **Metabolic Syndrome and Skin Diseases.** *Frontiers in Endocrinology*, 2019.
- JIN, T.; PARK, K. Y.; SEO, S. J. Adiponectin upregulates filaggrin expression via SIRT1-mediated signaling in human normal keratinocytes. **Annals of Dermatology**, v. 29, n. 4, 2017.
- KIDD, Darren Andrew; JOHNSON, M.; CLEMENTS, J. Development of an in vitro corrosion/irritation prediction assay using the EpiDerm™ skin model. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 7, p. 1292-1297, 2007.
- KIM, B. S. et al. 3D Cell Printing of Perfusable Vascularized Human Skin Equivalent Composed of Epidermis, Dermis, and Hypodermis for Better Structural Recapitulation of Native Skin. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 7, 25 abr. 2019.
- KIM, Byoung Soo et al. 3D cell printing of perfusable vascularized human skin equivalent composed of epidermis, dermis, and hypodermis for better structural recapitulation of native skin. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 7, p. 1801019, 2019.
- KLINGELHUTZ, A. J. et al. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.
- KHALIL, Saif; SUN, Wei. Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs. 2009.
- KONG, Y. et al. **New insights into different adipokines in linking the pathophysiology of obesity and psoriasis.** *Lipids in Health and Disease*, 2019.
- KRUGLIKOV, I. L.; ZHANG, Z.; SCHERER, P. E. **The Role of Immature and Mature Adipocytes in Hair Cycling.** *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2019.

- LI, Minggan et al. Effect of needle geometry on flow rate and cell damage in the dispensing-based biofabrication process. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 6, p. 1777-1784, 2011.
- LANGHANS, S. A. **Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning**. **Frontiers in Pharmacology**, 2018.
- LEE, S. H. et al. Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. **Annals of Dermatology**, v. 24, n. 2, 2012.
- MAK, I. W. Y.; EVANIEW, N.; GHERT, M. **Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment**. **American Journal of Translational Research**, 2014.
- MARIA-ENGLER, S. S. Harnessing skin reconstruction for testing topical agents in a healthy and diseased skin. **Toxicology Letters**, v. 259, 2016.
- MARIA-ENGLER, S. S. **Assessing the effects of advanced glycation end products in the skin**. **British Journal of Dermatology**, 2017.
- STUCHI MARIA-ENGLER, Silvy et al. Pele artificial como alternativa para experimentação em animais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, p. 118-125, 2010.
- MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. **Modelling tissues in 3D: The next future of pharmaco-toxicology and food research?** **Genes and Nutrition**, 2009.
- MIN, D. et al. Bioprinting of biomimetic skin containing melanocytes. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 5, 2018.
- MINI, C. A. et al. Immortalized equivalent human epidermis as a platform to evaluation hair dyes toxicity: Efficiency comparison between 3D and monolayer culture. **Chemico-Biological Interactions**, v. 330, 2020.
- MINI, C. A. et al. Immortalized keratinocytes cells generates an effective model of Epidermal Human Equivalent for irritation and corrosion tests. **Toxicology in Vitro**, v. 71, p. 105069, mar. 2021.
- MOON, K. M. et al. The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, 2012.
- NAIR, Kalyani et al. Characterization of cell viability during bioprinting processes. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 4, n. 8, p. 1168-1177, 2009.
- NICU, C. et al. **A guide to studying human dermal adipocytes in situ**. **Experimental Dermatology**, 2018.
- NING, Liqun et al. Characterization of cell damage and proliferative ability during and after bioprinting. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 11, p. 3906-3918, 2018.
- OECD TG 439. **Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method**. [s.l.] OECD, 2021.

- PEDROSA, T. DO N. et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 31–37, 2017.
- PEDROSA, T. N. **Desenvolvimento de Epiderme Humana Reconstruída (RHE) como plataforma de testes in vitro para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunossupressão.** [s.l.: s.n.].
- PENNACCHI, P. C. et al. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue Engineering - Part A**, 2015.
- PLIKUS, M. V. et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. **Science**, v. 355, n. 6326, 2017.
- RAVI, M. et al. 3D cell culture systems: Advantages and applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, 2015.
- RAMASAMY, Srinivas et al. Optimized construction of a full thickness human skin equivalent using 3D bioprinting and a PCL/collagen dermal scaffold. **Bioprinting**, v. 21, p. e00123, 2021.
- SCHMIDT, B. A.; HORSLEY, V. Intra-dermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. **Development (Cambridge)**, v. 140, n. 7, 2013.
- SCHOLZ, S. et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, 2013.
- SHIBATA, S. et al. Adiponectin Regulates Cutaneous Wound Healing by Promoting Keratinocyte Proliferation and Migration via the ERK Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, 2012.
- STOLBERG, Sarah; MCCLOSKEY, Kara E. Can shear stress direct stem cell fate?. **Biotechnology progress**, v. 25, n. 1, p. 10-19, 2009.
- SUN, T. et al. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 3, 2006.
- SYLVESTER, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 716, 2011.
- TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. **Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture.** **Biotechnology and Bioengineering**, 2009.
- VERMETTE, M. et al. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 18, p. 2850–2860, 2007.
- WAHLBERG, B. et al. Ex vivo biomechanical characterization of syringe-needle ejections for intracerebral cell delivery. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9194, 15 dez. 2018.
- WASKO, R. R.; HORSLEY, V. **Thin Skinned: Aged Adipocyte Atrophy Impacts Innate Immunity.** **Trends in Immunology**, 2019.

WYMA, Alex et al. Non-Newtonian rheology in suspension cell cultures significantly impacts bioreactor shear stress quantification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 8, p. 2101-2113, 2018.

YAMANE, T.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; OISHI, Y. Adiponectin promotes hyaluronan synthesis along with increases in hyaluronan synthase 2 transcripts through an AMP-activated protein kinase/peroxisome proliferator-activated receptor- α -dependent pathway in human dermal fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 2, 2011.

YAN, W. C. et al. **3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation**. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018.

YUE, Danyang et al. The rate of fluid shear stress is a potent regulator for the differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 9, p. 16312-16319, 2019.

ZANONI, T. B. et al. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). **Toxicology Letters**, v. 227, n. 2, 2014.

ZANONI, T. B. et al. Allergens of permanent hair dyes induces epidermal damage, skin barrier loss and IL-1 α increase in epidermal in vitro model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, fev. 2018.

ZHAN, Caijuan et al. Low shear stress increases recombinant protein production and high shear stress increases apoptosis in human cells. **IScience**, v. 23, n. 11, 2020.

ZHANG, L. J. et al. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. **Science**, v. 347, n. 6217, 2015.

ZHAO, X. et al. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 1, 2016.



Laboratório de Controle Molecular de Microorganismos Contaminantes

Universidade Estadual de Maringá, Bloco B09, sala 22A
Av. Colombo, 5790 Maringá – Paraná - CEP 87020-900
FONE (44) 3011-5455 melconsolaro@uem.br

Data: 27/07/2020

Código das amostras: amostras **130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138 e 139.**

Procedência: USP/SP

Solicitante: Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

Pesquisa de microrganismos contaminantes e potencialmente infectantes em queratinócitos humanos

Método: Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Microorganismos pesquisados (n = 12):

Vírus: HPV, HSV-1, HSV-2, Citomegalovírus, Hepatite B, Hepatite C, HIV-1

Bactérias: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum*

Parasitas: *Trichomonas vaginalis*

Resultado: negativo para as amostras **130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138 e 139**

para todos os agentes pesquisados.

Todas as sete amostras foram positivas para gene da B-globina humana, controle interno para validação dos resultados.

Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro/PQ1D

CNPq/Farmácia

Coordenadora do Laboratório

Docente Associada C

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina

Universidade Estadual de Maringá



Bioprinted and manual human epidermis production: A compared performance for skin irritation tests

Julia de Toledo Bagatin^{a,1}, Denisse Esther Mallaupoma Camarena^{a,1}, Luciana Harumi Osaki^b, Vanessa M. Freitas^b, Renaira Oliveira da Silva^a, Juliana C. Lago Nold^c, Silvyta Stuchi Maria-Engler^{a,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

^b Department of Cell and Developmental Biology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo, Brazil

^c Naturum Cosméticos S/A, Cajamar, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bioprinting
Dispensing mechanisms
Reconstructed human epidermis
Skin mimetic models
In vitro skin irritant test
Barrier function
Chemical-induced irritation
Inflammatory profile

ABSTRACT

The progress of bioengineered skin models relies on increasing their human relevance and reliability as platforms to evaluate the safety of consumable products. 3D bioprinting allows the precise spatial control in the deposition of biological materials to achieve more relevant and representative skin mimetic models. Still, methodological comparison of bioprinting to the traditional manual dispensing system for *in vitro* reconstructed human epidermis (RHE) models is scarce in the literature. In this way, this study compares the performance of a bioprinted (B-RHE) to a manually (M-RHE) reconstructed human epidermis at the *in vitro* skin irritation test described in the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guideline 439 (TG 439), that allows *in vitro* hazard identification of irritant chemicals using validated RHE for safety assessment. Our results show that both models exhibited a well-stratified and multiple layered epidermis. The epidermal barrier function achieved equivalent performance standards to the validated RHE models described in TG 439. At *in vitro* irritation test, the performance of bioprinted epidermal models was similar to manual methodology as they correctly discriminated the selected reference substances classified as an irritant or non-irritant according to tissue viability threshold value (50%), which indicates that bioprinting can be of great contribution to the automation of reconstruction of epidermal models. However, a previously unpublished inflammatory response was significantly higher for the bioprinted methodology, even after the exposure to non-irritative substances. Therefore, although the bioprinted epidermal model is qualified to be used as a platform for the *in vitro* irritation test, the extrusion bioprinting that utilizes cylindrical needles can indirectly exacerbate inflammatory response. Finally, the ideal dispensing system must be considered for bioprinting tissue mimetics to be used as platforms to the evaluation of risk assessment.

1. Introduction

As a more representative and ethical alternative for animal experimentation, the advances in tissue engineering allow the construction of increasingly similar *in vitro* human mimetic tissues for efficacy and safety assessments of consumable products [1]. The reconstruction of human skin models provides a validated platform for irritation assessment of topical products and chemicals, but constant updates of these models are demanded [2,3]. In this way, the recent bioprinting technology is promising due to its advantages in automation and scalability and the possibility of performing a spatial pre-deposition of biomaterials to

achieve more representative and reproducible skin models [4]. Nevertheless, many challenges remain from the simple manufacturing of tissue substitutes towards being an answer to today's main biomedical challenges, including drug development, disease, tissue/organ modeling, and precision medicine.

Reconstructed human epidermis (RHE) was the first *in vitro* skin tissue produced. This achievement was made possible since Rheinwald and Green (1975) [5] unveiled keratinocyte's modified culture medium and later by the implementation of this culture in an air-liquid interface by Pruniéras, Régnier and Woodley (1983) [6]. Since then, the typical epidermal *in vitro* model comprises keratinocytes seeded over a collagen matrix by manual pipetting techniques. However, the epidermal model

* Corresponding author.

E-mail address: silvyta@usp.br (S.S. Maria-Engler).

¹ The authors contributed equally as first authors.

<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00251>

Received 3 May 2022; Received in revised form 12 October 2022; Accepted 21 October 2022

Available online 29 October 2022

2405-8866/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

CAPÍTULO II

PELE HUMANA RECONSTRUÍDA CONTENDO HIPODERME

RESUMO

O tecido adiposo hipodérmico possui importante papel na homeostase da pele humana, ao regular diversas funções como cicatrização e fechamento de feridas, imunidade inata e função barreira epidérmica. Portanto, o desenvolvimento de um modelo de pele humana tricamada contendo adipócitos, que representam as células da hipoderme podem ser de grande contribuição no estudo da associação da pele a doenças metabólicas e cicatrização de feridas, além disso fornece uma plataforma mais representativa à pele humana para teste de segurança e eficácia de produtos farmacêuticos. A pele tricamada foi construída a partir da maturação de células mesenquimais multipotentes primárias extraídas de pacientes submetidos à abdominoplastia após a aprovação do comitê de ética. Estas foram induzidas à diferenciação *in vitro* a adipócitos usando suplementação contendo insulina, isobutilmetilxantina, dexametasona e rosiglitazone, fármaco agonista de PPAR- γ . As culturas tridimensionais, usando esferóides representam de forma mais autêntica o metabolismo lipídico dos adipócitos e assim, estes foram usados para a construção dos modelos de pele tricamada em matriz de colágeno. Ao comparar o modelo obtido de pele tricamada com o modelo de pele bicamada, que contém as camadas epidérmica e dérmica, obtivemos maior expressão de loricrina (49,5% vs 121,7%) e involucrina (75,5% vs. 108,0%) na pele tricamada, indicando um potencial para maior função barreira. Além disso, houve maior expressão de PPAR- γ ($p=0,0202$) na pele tricamada por esta apresentar um metabolismo lipídico mais relevante. Testes de função barreira através da resistividade elétrica não demonstraram diferenças significativas entre os modelos de pele, mas a aplicação de SDS a 5 mg/ml por 18 horas induziu o aumento da viabilidade celular nos modelos de pele tricamada em 50% ($p<0,0001$). Com a presença de adipócitos, a pele tricamada foi testada em seu potencial para a recuperação de lesões irritativas agudas, SDS foi aplicado nos modelos de pele a 2,5% para induzir uma irritação aguda por 15 min, que foi seguida de recuperação por 42h. A presença diferencial de adiponectina e de PPAR- γ na pele tricamada, que se conectam em vias de sinalização que se retroalimentam, podem indicar que esta apresenta melhor recuperação pós-lesão irritativa induzida e uma modulação da inflamação dos queratinócitos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele Tricamada Reconstruída *in vitro*: a importância do tecido adiposo

O tecido adiposo foi negligenciado por muito tempo na área científica e médica como se apenas exercesse funções de armazenamento de energia e termorregulação. Atualmente, se reconhece o importante papel do tecido adiposo na regulação endócrina e na resposta imunológica, como um órgão que secreta diversas citocinas, fatores de crescimento e hormônios, que podem atuar localmente ou sistemicamente.

O papel do tecido adiposo da pele, na camada hipodérmica, foi aceito a partir do reconhecimento que disfunções dermatológicas apresentam associação com dislipidemias. Importante mencionar que a síndrome metabólica, caracterizada por alterações como obesidade abdominal e dislipidemia, estão associadas com doenças de pele como psoríase, dermatite atópica, acne vulgar, alopecia androgênica e acantose negricans (Hu et al., 2019; Kong et al., 2019).

Atualmente se reconhece que a camada hipodérmica apresenta papel importante na sinalização parácrina da pele, já que esta apresenta funções relevantes para a proteção cutânea e manutenção da homeostase da pele (Nicu et al., 2018).

Embora os principais depósitos de tecido adiposo branco sejam primariamente responsáveis pelo depósito de energia, secreção de hormônios e na termorregulação do organismo de forma sistêmica, alguns tipos secundários de depósito desenvolveram funções especiais e não convencionais. Diferente de qualquer depósito de gordura, o tecido adiposo branco dérmico se aprimorou com um grande repertório de funções locais e fundamentais à fisiologia da pele. Comparado a outros depósitos convencionais de gordura, o associado à derme possui funções específicas relacionadas a pele, e tem a capacidade de expandir ou contrair em resposta a diferentes estímulos. Dentre essas funções, por sua abundância de fatores de crescimento, a regulação do ciclo dos folículos pilosos é íntima ao tecido adiposo branco dérmicos e muito bem estabelecida (Guerrero-Juarez; Plikus, 2018; Kruglikov; Zhang; Scherer, 2019). Estes também estão envolvidos com os mecanismos de reparo e cicatrização de ferimentos da pele pela secreção de indutores de reparo (Plikus et al., 2017) e atuam na formação de fibrose e cicatrizes (Marangoni et al., 2015; Varga and Marangoni, 2017; Zhang et al., 2019). Além disso,

protegem a pele contra bactérias pela produção de peptídeos antimicrobianos e moderam a resposta imune inata local (Wasko & Horsley, 2019; Zhang et al., 2015).

O desenvolvimento dos adipócitos dérmicos depende de um progenitor adiposo, incluindo as células estromais adiposas, que podem ser isoladas do tecido adiposo. A maturação adipogênica envolve uma extensa sinalização, como a proteína morfogênica óssea (BMP), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), proteínas Hedgehog e as vias WNT. Portanto, além das adipocinas, que são hormônios sintetizados pelo tecido adiposo, o tecido adiposo dérmico secreta múltiplas sinalizações parácrinas e fatores modificadores de matriz (Guerrero-Juarez; Plikus, 2018).

Estudos mostram que quando os adipócitos são colocados em co-cultura em monocamada com queratinócitos, estes estimulam sua proliferação e diferenciação (Moon et al., 2012). Além disso, as células pré-adipócitas também promovem a diferenciação, expansão e organização dos queratinócitos (Aoki et al., 2004). Adipócitos cultivados com fibroblastos e queratinócitos demonstram o mesmo efeito proliferativo, e um papel importante para a cicatrização de feridas por meio do recrutamento dos fibroblastos (Lee et al., 2012; Schmidt & Horsley, 2013).

Os adipócitos dérmicos são responsáveis pela síntese e liberação de adipocinas, como a adiponectina, e pelo armazenamento e liberação de ácidos graxos. Os atuais modelos de pele tridimensional reconstruída apresentam a função barreira mais permeável e com maior perda de água em comparação com a pele humana (Garcia et al., 2002). A síntese de adiponectina pelos adipócitos dérmicos estão associadas com a regulação da expressão de filagrina na camada córnea humana (Choi et al., 2018; Jin; Park; Seo, 2017). Além disso, a adiponectina aumenta a síntese de lipídeos neutros, esfingolipídeos e atua na melhor diferenciação dos queratinócitos em modelos de epiderme humana reconstruída (Hong et al., 2019). Assim, a adição de adipócitos, pela síntese de adiponectina, podem auxiliar a se obter um modelo de pele tridimensional com a função barreira aprimorada.

Como um modificador de matriz, a presença dos adipócitos tem influência na composição da matriz dérmica da pele. Pela síntese de adiponectina, os fibroblastos dérmicos têm sua proliferação e produção de colágeno aumentada (Ezure; Amano, 2007), assim como a de ácido hialurônico (Yamane; Kobayashi-Hattori; Oishi, 2011). Por este motivo há uma hipótese de que a redução da camada de tecido adiposo do rosto com a

idade, e a consequente redução na síntese de adiponectina, pode estar relacionada com o envelhecimento da pele (Akazawa et al., 2011).

Mesmo que a camada de tecido adiposo dérmico seja um componente estrutural responsável por importantes funções locais para pele humana, a influência da camada hipodérmica sobre as outras células epiteliais em um modelo tridimensional de pele bioimpressa é escasso, sendo que a maioria desses estudos se referem a culturas em monocamada. Portanto, o aprimoramento da engenharia de tecidos, como a da pele humana, pode depender da adição de seus outros tipos celulares constituintes, como os adipócitos.

Ainda assim, a inclusão de novos tipos celulares em modelos de pele *in vitro* que representem a mesma funcionalidade biológica existente em seu tecido *in vivo* não é trivial e representa um grande desafio na bioengenharia de tecidos. Em modelos miméticos é complexa a mediação, regulação e maturação de cada célula individualmente no mesmo período, já que o microambiente requerido para a nutrição, além do tempo de cultura para a maturação do tecido variam de acordo com as características de cada tipo celular utilizado (NG et al. 2018).

Por fim, um modelo de pele contendo a terceira camada da pele, a hipoderme, representada por adipócitos, pode prover uma plataforma de testes para segurança e eficácia de produtos farmacêuticos mais representativo à pele *in vivo*, além de permitir o estudo de suas complexas funções metabólicas, de reparação e modulação imune na pele humana.

2. OBJETIVOS

Neste capítulo buscamos analisar o papel dos adipócitos em modelos tridimensionais de pele reconstruída *in vitro*, aprofundando nossa compreensão da interação parácrina entre as células epiteliais e o tecido adiposo dérmico, principalmente sua influência na função de barreira e na recuperação pós-irritação química, com ênfase na liberação de adiponectina.

Portanto, este projeto objetiva contribuir para o avanço na engenharia de tecidos da pele humana, permitindo o desenvolvimento de modelos mais completos e precisos que incorporem todos os principais componentes celulares, incluindo os adipócitos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura celular

Para a reconstrução *in vitro* dos modelos de pele humana contendo a camada hipodérmica, foram usadas as células primárias extraídas de excessos cirúrgicos representativas à pele humana: queratinócitos, fibroblastos e adipócitos. Assim as células primárias isoladas (queratinócitos e fibroblastos), descritas anteriormente no Capítulo I, também foram usadas neste capítulo.

3.1.1.a. Padronização do meio de diferenciação celular dos pré-adipócitos a adipócitos em cultura

As células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar a adipócitos *in vitro* para o estabelecimento do melhor método de diferenciação baseado em diferentes literaturas (Lee et al., 2012; Zebisch et al., 2012; Turner et al., 2015; Zoico et al., 2015). O protocolo foi selecionado para a posterior diferenciação das células humanas mesenquimais estromais multipotentes para adipócitos humanos. Os meios para a indução adipogênica dos pré-adipócitos variaram nas concentrações de insulina, adição de rosiglitazona para ativação de PPAR- γ e de acordo com o tempo do meio de indução adipogênica. Para a identificação e escolha do melhor meio de diferenciação adipogênica utilizou-se uma placa de 12 poços para o cultivo de 2×10^4 células 3T3-L por poço, contendo com 3 ml de meio DMEM e 10% de SFB. Após 2 dias foram adicionados os meios de diferenciação às células já aderidas. No momento da indução de diferenciação, troca-se o meio DMEM, não utilizando soro, acrescido dos seguintes suplementos para cada grupo, de acordo com o quadro abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos grupos para indução da diferenciação celular dos adipócitos.

Grupo	Descrição do Grupo	Tempo de indução adipogênica	Suplementos do meio de diferenciação
--------------	---------------------------	-------------------------------------	---

Grupo 1	Meio de diferenciação básico	48h	- IBMX 0,5 mM -dexametasona 1uM - insulina 0,5 ug/ml
Grupo 2	Meio básico com mais insulina	48h	- IBMX 0,5 mM - dexametasona 1 uM - insulina 5 ug/ml
Grupo 3	Meio básico com Rosiglitazona	48h	- IBMX 0,5mM; - dexametasona 1uM; - rosiglitazona 2uM; - insulina 0,5ug/ml.
Grupo 4	Meio básico com Rosiglitazona e mais insulina	48h	- IBMX 0,5mM; -dexametasona 1uM; - rosiglitazona 2uM; - insulina 5ug/ml.
Grupo 5	Meio básico 96h	96h	- IBMX 0,5 mM -dexametasona 1uM - insulina 0,5 ug/ml
Grupo 6	Controle – sem meio de diferenciação	48h	N.A.

Legenda: IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina; DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; SFB – soro fetal bovino; NA- não se aplica. Notas: todos os suplementos do meio de diferenciação descritos, IBMX, dexametasona, insulina e rosiglitazona são Sigma-Aldrich.

Após os dias de manutenção nos meios descritos por 48 horas ou 96 horas, os meios foram trocados para a manutenção adipogênica, que consiste em DMEM e 10% de SFB, suplementado com a mesma concentração de insulina usada para a diferenciação e mantida até completar 10 dias de cultura.

3.1.1.b. Avaliação da indução adipogênica

Para avaliar a diferenciação celular, as células foram coradas com Oil Red O (Merck), corante específico para a maturação dos adipócitos quando da presença e acúmulo de lipídios neutros que se ligam ao perfil lipofílico do corante (Lee et al., 2012; Gojanovich et al., 2018). Para verificar a maturação celular usando o corante Oil Red O, após 10 dias, as células cultivadas com os tratamentos de diferenciação foram lavadas com cuidado com PBS. Adicionou-se 1 ml de formalina 10% por 40 minutos em geladeira 4°C. A solução mãe de Oil Red O foi preparada a 0,5% em isopropanol e filtrada em papel filtro. Para a solução de uso uma diluição de 3:2 em água MilliQ (a 0,3%) foi filtrada

novamente usando filtro de 20 µm (Corning). A solução de Oil Red foi adicionada nos poços por 30 minutos, após uma lavagem com água MilliQ, adicionou-se 500 µl de água por poço para obter as imagens da diferenciação em microscópio óptico (Nikon Eclipse TS100).

3.1.2. Isolamento e manutenção das células estromais mesenquimais multipotentes

A obtenção de adipócitos humanos é realizada a partir do isolamento das células estromais mesenquimais multipotentes presentes no tecido adiposo, as quais podem ser induzidas *in vitro* a se diferenciarem em adipócitos humanos.

As amostras de tecido adiposo foram obtidas na forma de lipoaspiração ou como tecido excedente de abdominoplastia, também chamada de dermolipectomia abdominal, que contém epiderme, derme e o tecido adiposo subcutâneo de interesse. Após a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, (CAAE: 38645020.9.0000.0067), as amostras de tecido adiposo foram obtidas sob consentimento informado dos pacientes submetidos às cirurgias de abdominoplastia e/ou lipoaspiração atendendo aos seguintes critérios de inclusão: IMC<30kg/m² (não obesos), menos de 55 anos, não diabéticos e não hipertensos, sob responsabilidade do médico cirurgião-plástico Dr. Victor Augusto Thomé Grillo. Para cada forma de tecido adiposo obtido, uma preparação distinta para o isolamento celular foi realizada.

As amostras de abdominoplastia foram inicialmente acondicionadas em placas de 100 mm e fragmentadas em tamanhos menores com cerca de 10 mm, com auxílio de tesoura e pinças cirúrgicas estéreis. Em seguida, foram descontaminadas de possíveis patógenos por esterilização rápida com banho em etanol 70%, seguida de banhos em tampão PBS contendo ampicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/mL). O tecido adiposo e a pele foram separados com auxílio de tesoura e pinça estéreis. Após a limpeza inicial do tecido adiposo, onde foram retirados vasos sanguíneos e tecido fibroso, o tecido foi fragmentado em frações menores que 10 mm, com auxílio de bisturi e incubados em solução de colagenase II a 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) em PBS, por 2 horas à 37°C. As etapas que se seguem à digestão enzimática foram as mesmas que as das amostras de lipoaspiração, descritas a seguir.

As amostras de lipoaspiração foram inicialmente divididas em frações de aproximadamente 30 ml em tubos de 50 ml e submetidas a centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Assim, as amostras se separam em fases, sendo que a fração de interesse foi o sobrenadante da amostra que contém o tecido adiposo, devido à menor densidade que a da fase aquosa. Em seguida, foram realizadas no mínimo 3 lavagens com a adição de PBS contendo antibióticos, seguido de centrifugação dos tubos a 1500 rpm, por 3 minutos e retirada da fração oleosa acima do tecido adiposo e do volume da fração aquosa com auxílio de uma pipeta volumétrica de 10 ml, conforme a Figura 1.

Figura 1. Separação de fases das amostras de lipoaspiração após centrifugação.



Após as lavagens, foi adicionado 30 ml de solução de colagenase II (Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml em PBS por 2 horas a 37°C, com agitação forte manual a cada 15-20 minutos, até a obtenção de uma solução homogênea. A enzima foi neutralizada pela adição de 10 ml de DMEM com 10% de SFB, e os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Após a lise enzimática do tecido, o sobrenadante foi descartado, e 10 ml de tampão de lise de eritrócitos (155 mM NH₄Cl, 5,7 mM K₂HPO₄, 0,1 mM EDTA, pH 7,3) estéril foi adicionado por 4 minutos, seguido de 10 ml de DMEM com 10% de SFB e centrifugação a 1500 rpm por 3 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado meio de cultura DMEM:HAM's F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA) contendo 10% de SFB. A solução contendo as células estromais mesenquimais multipotentes foram filtradas em *cell strainer* de 100 µm, seguido do filtro de 40 µm e adicionadas em garrafas médias, mantidas em cultura em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as placas foram lavadas com PBS para retirar o excesso de células não aderidas e foi adicionado meio de cultura DMEM:HAM F12 contendo 10% de SFB, em cultura em incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

3.1.2.a. Caracterização de fenótipo celular das células isoladas por citometria de fluxo

A partir do isolamento das células primárias a partir do tecido adiposo, foi necessário verificar o fenótipo celular por citometria de fluxo para garantir a caracterização das células mesenquimais multipotentes humanas (HASC), capazes de se diferenciar em adipócitos maduros por indução adipogênica.

Utilizando o *Human MSC Analysis Kit* (BD Biosciences, nº562245) identificamos um painel de marcadores de superfície celular proposto para a caracterização das células mesenquimais multipotentes sugeridos pela *International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Usando uma mistura de anticorpos conjugados com fluoróforos, estas células devem ser positivas para: CD90-FITC, CD105-PerCP-Cy™ e CD73-APC (coquetel positivo) e devem ser negativas para outros anticorpos conjugados com o fluoróforo PE que reconhecem os marcadores de superfície que caracterizam outros tipos celulares: CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR (coquetel negativo). Para compensação da citometria de fluxo, CD90-FITC, CD105-PerCP-Cy™, CD73-APC e CD44-PE são usados (5 tubos). O kit também contém os controles isotípicos correspondentes ao coquetel positivo e negativo, além do controle (contendo nenhum anticorpo).

As células isoladas dos pacientes de #1 a #6 foram expandidas por 2 semanas em meio DMEM:HAM com 10% de SFB. As células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer para a obtenção de aproximadamente 5×10^6 de células/ml após centrifugação e ressuspensão com PBS contendo 2% de SFB. A amostra #1 que continha maior população celular foi usada para compensação do citômetro e 100 ul de sua suspensão celular foi dividida em 7 tubos, em 5 foram adicionados separadamente 5 ul dos anticorpos para compensação do citômetro, enquanto no restante dos tubos se adicionava o controle isotípico negativo, positivo e o controle e seus coquetéis correspondentes. Nas amostras seguintes, 3 tubos distintos contendo 100 ul da suspensão celular foram divididos e nestes adicionados 20ul dos controles isotípicos negativo, positivo e o controle, junto a 20 ul de seu correspondente coquetel negativo ou positivo. As amostras foram incubadas por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após a incubação, essas foram lavadas duas vezes com PBS contendo 2% de SFB, e centrifugação a 1800rpm por 5 minutos.

A citometria de fluxo foi realizada através do citômetro BD FACSCanto™ (BD Biosciences) que contém um sistema óptico de análise de canais de fluorescência FITC, PE, PE-CY7, PERCP/PERCPCY5. 5, APC e APC-CY7 em colaboração com Renata Chaves Albuquerque. Após a calibração do equipamento e compensação dos anticorpos, a técnica usada para avaliação da citometria de fluxo foi inicialmente analisar as características da população celular, depois remover os *dublets*, excluir as células marcadas com os anticorpos negativos e depois avaliar triplamente os anticorpos negativos, essa estratégia é aplicada para as células controle (sem anticorpos), para o isotipo negativo e para o coquetel positivo partir de gráficos de pontos avaliado pelo software BD FACSCanto™ Clinical Software.

3.3. Desenvolvimento do protocolo de pele tricamada

Para a seleção da melhor metodologia para se obter a pele contendo um modelo tricamada realizaram-se diversos protocolos utilizando o colágeno como matriz principal de sua composição, assim como observado *in vivo*.

3.3.1. Construção e caracterização dos esferoides de adipócitos

Dos métodos existentes para construção de esferoides, foi usado a técnica da gota suspensa, ou *hanging drop*. Em geral, esta técnica pode formar eficientemente esferoides celulares.

3.3.1.1. Construção dos esferoides

Após coletar as células pré-adipócitas em uma concentração final de 1×10^6 /ml em meio DMEM com 10% de SFB, 20 ul foi dispensado em cada gota, contendo o total de 10.000 células/gota em uma tampa de uma placa de 96 poços. Ao término da dispersão, a tampa foi invertida tampando a placa, formando-se gotas contendo as células suspensas na tampa. Após 4 dias para a formação do esferóide, esses foram coletados e colocados na base da correspondente placa de 96 poços com baixa aderência (Corning® 96-well Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment Microplate, ref. 7007). Para induzir a

obtenção de esferoides de adipócitos maduros a partir de seu progenitor de células mesenquimais multipotentes 200 μ l de meio de indução adipogênica foi adicionado, conforme estabelecido anteriormente 1: 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma-Aldrich) 0,5 mM; dexametasona 1 μ M (Sigma-Aldrich); insulina 0,5 μ g/ml (Sigma-Aldrich); rosiglitazona 2 μ M (Sigma-Aldrich).

3.3.1.1.a. Caracterização dos esferoides

As principais caracterizações foram morfológicas após coleta e corte em blocos de parafina dos esferóides. Na caracterização histológica realizamos 2 tipos de marcações, por hematoxilina-eosina e com tricromio de Masson. Para as análises histológicas, preparamos as lâminas com os cortes da amostra (3 μ m), estas foram desparafinadas e hidratadas em álcool de diferentes concentrações até chegar na água destilada, seguidamente coramos as amostras com eosina (2 minutos) e hematoxilina por 5 minutos e lavamos em água. Para a coloração de Masson, a seguinte coloração foi realizada: escarlata de Briebich-fucsina ácida por 5 minutos, 5 minutos em ácido fosfomolibdico-ácido fosfotúnstico e azul de anilina por 5 minutos. Finalmente as amostras foram levadas para o processo de desidratação e montagem das lâminas.

3.3.2. Construção de pele tricamada *in vitro*

Estudamos o desenvolvimento de dois protocolos para a pele tricamada (pele normal com hipoderme). Para o desenvolvimento do protocolo da construção da pele tricamada usamos a diluição de colágeno I como já estabelecida em nosso laboratório seguindo o protocolo para confecção da derme do modelo de pele normal (Catarino et al., 2018).

3.3.2.a. Protocolo I: tricamada derme

A construção da derme foi reconstruída pela adição de $1,5 \times 10^5$ fibroblastos de uma solução de colágeno tipo I (3 mg/ml) em conjunto com 30 esferoides descritos anteriormente. A solução de colágeno é composta por 100 μ L de meio Ham's F12 10X (Gibco), 100 μ L de tampão de reconstituição 10X (2,2% NaHCO₃, NaOH 0,05M, HEPES 200mM) e 700 μ L de colágeno tipo I (3~4 mg/mL) (BD Biosciences, MA, USA). A solução de colágeno contendo os fibroblastos e esferóides juntos, é então transferida para placas de 24 poços (~0,8mL/poço) e mantidas em incubadora à 37°C por 15 a 30

minutos para polimerização do colágeno, resultando em um gel de colágeno com fibroblastos. Após a polimerização é adicionado 1mL de meio de DMEM por poço sobre os géis para normalização do pH. A placa é então mantida por cerca de 1 hora à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, até a adição de queratinócitos primários humanos. Depois, para a construção da epiderme, 25 x 10⁴ queratinócitos foram semeados sobre a cultura de fibroblastos- esferoides, a co-cultura foi mantida em meio RAFT:KGM (1:1). Após 24 horas, a co-cultura foi levada à interface ar-líquido por 11 dias (37 °C, 5% de CO₂).

3.3.2.b. Protocolo II: Tricamada derme separada

Assim como o protocolo anterior, a derme foi reconstruída pela adição de 1,5 x 10⁵ fibroblastos de uma solução de colágeno tipo I, porém essa solução também foi usada separadamente para se adicionar 30 esferoides. A solução de colágeno é composta por 100 µL de meio Ham's F12 10X (Gibco), 100 µL de tampão de reconstituição 10X (2,2% NaHCO₃, NaOH 0,05M, HEPES 200mM) e 700 µL de colágeno tipo I (3~4 mg/mL) (BD Biosciences, MA, USA). Para constituir a hipoderme, 450 µl da solução de colágeno contendo inicialmente esferóides e 7 x 10⁴ fibroblastos, é então transferida para placas de 24 poços e mantidas em incubadora à 37°C por 15 minutos para polimerização do colágeno, resultando em um gel de colágeno com fibroblastos. Após a polimerização é adicionada 450 µl da solução de colágeno contendo apenas 7 x 10⁴ fibroblastos. Após 15 min de polimerização, 1mL de meio de DMEM por poço sobre os géis para normalização do pH. A placa é então mantida por cerca de 1 hora à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, até a adição de queratinócitos primários humanos. Depois, para a construção da epiderme, 25 x 10⁴ queratinócitos foram semeados sobre a cultura de fibroblastos- esferoides, a co-cultura foi mantida em meio RAFT:KGM (1:1). Após 24 horas, a co-cultura foi levada à interface ar-líquido por 11 dias (37 °C, 5% de CO₂).

3.3.3. Caracterização histológica e imunohistoquímica da pele tricamada

Para as análises histológicas e imunohistoquímicas, as amostras foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol e xilol, respetivamente, e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 4 µm. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) ou tratado como anticorpo correspondente para imunohistoquímica.

Para a análise imunohistoquímica, as lâminas com as amostras parafinizadas foram submersas em xilol (2 vezes, 4 minutos), etanol absoluto (3 vezes, 2 minutos), etanol 90 ° (1 vez, 2 minutos), etanol 70° (1 vez, 2 minutos), etanol 50 ° (1 vez, 2 minutos) e água (2 vezes, 2 minutos). Depois da hidratação das amostras, iniciou-se o experimento para a marcação imunohistoquímica com o kit EnVision Flex (High pH, Dako Omnis, Santa Clara, CA, EUA). Após recuperação antigênica, bloqueio de peroxidase e bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 3%, seguindo as instruções do fabricante, as amostras foram incubadas com anticorpos primários: citoqueratina 14 (CK14, Ab 7800, Abcam), para citoqueratina 10 (CK10; Ab 9025, Abcam), involucrina (IVL, Ab27495, Abcam), Loricrina (LOR, Ab85679, Abcam) e filagrina (FLG, Abcam code 3137) e adiponectina (ab227051, Abcam) por 3 horas a 37°C. Os anticorpos secundários foram adicionados em sequência seguindo as instruções do kit EnVision Flex.

3.4. Comparação entre modelo de pele normal e pele tricamada

Após a definição do protocolo de pele tricamada a ser utilizado, foi delineado o desenho experimental para verificar a influência da camada hipodérmica no modelo de pele *in vitro*.

3.4.1. Esferoides de adipócitos

Os esferoides foram formados através do método de baixa adesão em micromolde de agarose em placas de cultura de 12 poços. O carimbo, feito a partir de impressão 3D, foi adquirido da empresa BioEdTech, e possui 96 espículos de 100 µm de diâmetro adaptado para se encaixar na placa de 12 poços (BioEdTech, São Paulo, Brasil). Após a adição de 1 ml de solução de agarose a 3% em PBS autoclavada, adicionou-se o carimbo pré-esterilizado até seu resfriamento completo, e então, foi retirado formando-se o micromolde de agarose. Após coleta das células mesenquimais multipotentes em confluência de até 80%, estas foram contadas e centrifugadas para se obter 1×10^6 células/ml a partir de uma mesclagem de pacientes para maior representatividade da variabilidade populacional, constituindo 3 grupos diferentes: A - pacientes 6 e 3, B – pacientes 4 e 2, C – pacientes 1 e 5. Assim, 1 ml de cada grupo de células foi adicionado a cada poço da placa de 12 poços contendo o micromolde. No total, 4 placas por grupo foram cultivadas em DMEM:HAM com 10% SFB por um total de 17 dias, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A cada 2 dias o meio contendo DMEM:HAM com 10% SFB foi

trocado, sendo que a partir do 3 dia de cultivo dos esferóides, este foi substituído pelo meio de diferenciação adipogênica selecionado a partir dos resultados obtidos com a células 3T3-L1. Este meio de cultura é composto por meio DMEM:HAM e suplementado com IBMX 0,5 mM; dexametasona 1uM; rosiglitazona 2uM e insulina 0,5ug/ml. A cada troca de meio, o sobrenadante dessa cultura (48h) foi coletado para quantificar a secreção de adiponectina e foram realizadas medidas do diâmetro dos esferóides.

3.4.1.a. Quantificação de adiponectina

A quantidade de adiponectina secretada no meio pelos esferóides de adipócitos indicam sua maturação. Para quantificar a adiponectina, o sobrenadante do meio de cultura dos distintos grupos de esferóides foram coletados a cada 2 dias, num total de 17 dias. Sendo que cada grupo contém 4 replicatas e foram realizadas 9 coletas, o total de amostras avaliadas foi de 108. Cada amostra foi analisada em duplicata técnica utilizando o ensaio imunoenzimático *Human Adiponectin/Acrp30 DuoSet* ELISA, catálogo DY1065 (R&D Systems, Minnesota, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A densidade óptica em 450 nm das amostras foi determinada usando o leitor de microplacas Synergy™ HT (Biotek Instruments, EUA). O cálculo dos resultados foi realizado pela interpolação dos valores de densidade óptica a partir de uma curva linear contendo o anticorpo padrão variando de 62,5 – 4000 pg/mL, $R^2=0,99$, a partir de 3 placas de 96 poços individuais pelo programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, MA, EUA).

3.4.1.b. Medida do tamanho do esferóide

A cada dia de troca do meio o tamanho dos esferóides (2-3 dias) também foram medidas diretamente na placa de cultura contendo os esferóides no micromolde usando o microscópio Nikon Eclipse Ti. Cerca de 10-15 esferóides foram medidos em cada um dos grupos de esferóides (3 grupos) e data de manipulação, utilizando o programa Nikon NIS Element (Nikon, Toquio, Japão), totalizando 339 medidas individuais.

3.4.2. Construção da pele tricamada e pele normal

A partir da seleção do protocolo anteriormente descrito “*Protocolo I: tricamada derme*”, este foi usado para a confecção de 20 peles para cada grupo de esferóides, como descrito anteriormente no item 3.4.1, definidos como grupo A, B e C. Este experimento

em triplicata foi desenhado para representar distintas populações de adipócitos primários (cada um com mesclagem de 2 pacientes diferentes). Algumas modificações foram realizadas: os esferoides usados foram compostos por 10.000 células/esferoide e ficaram um total de 18 dias em cultura, sendo que o anterior foi composto por 20.000 células/esferoide e este foi mantido em cultura por 10 dias até sua coleta para compor a pele tricamada; e não foram adicionados 30 esferóides por pele como no piloto para definição do método. O total de adipócitos contido nos quatro moldes de agarose foram coletados, centrifugados a 1500 rpm por 2 minutos, e após a remoção do sobrenadante foram adicionados no volume final de colágeno (16,2 ml) juntamente com 9×10^6 fibroblastos coletados e contados, seguindo o protocolo descrito no item 3.4.1. Estima-se que há cerca de 16 esferoides por pele feita, num total de 60 peles tricamada. Como somente a influência de diferentes populações de adipócitos tem o objetivo de serem avaliadas, as populações de queratinócitos e fibroblastos foram mantidas em todos os grupos, incluindo as peles completas usadas.

As peles bicamada seguiram o protocolo descrito por Catarino e colegas (CATARINO et al., 2018). Em resumo, a camada dérmica foi preparada usando colágeno tipo I de rabo de rato (Corning, Tewksbury, MA) e $1,5 \times 10^5$ de fibroblastos/pele. Após a polimerização do gel de colágeno, $2,5 \times 10^5$ de queratinócitos foram semeadas em cima da derme e mantidas submersas em RAFT (meio específico preparado internamente): meio KGM-Gold Bullet Kit (1:1) por 24 horas, seguido por 12 dias à interface ar-líquido. O meio RAFT foi preparado adicionando DMEM e meio Ham's-F12 (Gibco, Gaithersburg, MD) (3:1) com 10% de soro fetal bovino inativo (FBS, Gibco, Life Technologies, CA, EUA) e os suplementos: toxina colérica 10,1 nM, insulina 5 µg/mL, apo-transferrina 5 µg/mL, hidrocortisona 21-hemissuccinato 0,4 µg/mL, fator de crescimento epidérmico (EGF) 1 ng/mL. Um total de 40 peles divididas em dois grupos independentes com a mesma população de fibroblastos e queratinócitos foram confeccionadas em dias diferentes para serem comparados com as 60 peles divididas em 3 grupos independentes de pele tricamada, com variabilidade dos adipócitos, totalizando 100 peles e 5 grupos, definidos como grupos pele tricamada (A, B e C) e grupos controle pele normal (controle 1 e controle 2, CNT1 e CNT2).

3.4.2.a. Secreção de Adiponectina

Como a adiponectina é a principal citocina liberada pelos adipócitos, a sua secreção no sobrenadante do meio de cultura foi coletada e quantificada no dia da coleta das peles, ou seja, após 11 dias desde a sua reconstrução, para comparação entre a pele tricamada e a pele normal, por meio do ensaio imunoenzimático *Human Adiponectin/Acrp30 DuoSet* ELISA, catálogo DY1065 (R&D Systems, Mineápolis, Minnesota, EUA) seguindo as instruções do fabricante, como descrito anteriormente. A amostra consistia no sobrenadante do 11º dia de 6 peles de cada grupo das peles tricamada e peles controle, totalizando 30 amostras, realizadas em duplicata experimental.

3.4.2.b. Histologia e Imunohistoquímica

Para a comparação entre a pele normal e a pele tricamada, estas foram comparadas em secções histológicas coradas com H&E. As proteínas que caracterizam a estratificação da epiderme foram marcadas com os anticorpos primários: citoqueratina 14 (CK14, Ab 7800, Abcam), citoqueratina 10 (CK10; Ab 9025, Abcam), involucrina (IVL, Ab27495, Abcam), Loricrina (LOR, Ab85679, Abcam) e filagrina (FLG, Abcam code 3137), utilizando a imuno-histoquímica, assim como descrito anteriormente no item 3.3.3.

3.4.2.c. Avaliação da expressão proteica por Western Blotting

A partir de amostras de pele em quadruplicata para cada grupo de pele tricamada (A, B, C) e pele normal (CNT1 e CNT2) a extração de proteínas para Western Blotting (WB) foram preparadas em tampão Laemmi concentrado 2x (62,5 mM tris-HCl, 2% SDS, 8,7% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 0,2% ditioneitol). A proteína total (40 µg) foi submetida a eletroforese em gel de acrilamida com gradiente de 10-20% em condições redutoras e subsequente transferência para membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA). A membrana foi bloqueada com BSA 5% diluído em TBS-Tween 20 (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,1% Tween-20) por 1 hora e foram adicionados os seguintes anticorpos: Filagrina (FLG, ab53112, rabbit, diluição 1:500, Abcam), Loricrina (LOR, ab176322, rabbit, diluição 1:10.000, Abcam), Citoqueratina 10 (CK10, ab76318, rabbit, diluição 1:10.000, Abcam), Citoqueratina 14 (CK14, ab7800, mouse, diluição 1:1000, Abcam), PPAR-γ (ab59256, rabbit, diluição 1:500) e β-actina peroxidase (A3854, mouse, diluição 1:50.000, Sigma-Aldrich). As

bandas de proteínas foram detectadas por quimioluminescência aumentada (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, cat #32106, Thermo Fischer Scientific, Waltham, EUA) e semiquantificadas no software Image J.

3.4.2.d. Função Barreira

3.4.2.d.I. Teste de função barreira com SDS por 18 horas

A função barreira foi determinada pela concentração em que o dodecil sulfato de sódio (SDS), reduzem a viabilidade dos tecidos após 18 horas de exposição, como descrito por Bagatin et al. (2023). A viabilidade celular é medida pelo ensaio colorimétrico a partir da redução enzimática mitocondrial nas células metabolicamente ativas (viáveis) do sal insolúvel corante tetrazólio MTT em formazam. As soluções de SDS com as seguintes concentrações: 0; 1,25; 2,5; 5 mg/ml em água destilada foram aplicadas na superfície das peles com um volume de 30 µl, em duplicata. A solução de 0 mg/ml de SDS foi considerada o controle negativo.

Os tecidos foram lavados e incubados com 600 µL de MTT (1 mg/mL em DMEM) a 37 ° C em incubadora de CO2 a 5% por 3 horas. Após incubação, o excesso de MTT foi lavado com PBS, o tecido foi separado da malha de ferro e transferido para uma placa de 12 poços com 2 ml de isopropanol. A placa foi vedada com papel alumínio, e agitada por 2 horas (120 rpm). Após homogeneizar a solução, alíquotas de 200ul em triplicata foram transferidas para placa de ELISA junto ao branco (isopropanol puro) e avaliadas pelo espectrofotômetro Synergy HT- Biotek Multiplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, EUA), leitura a 570nm. A partir dos valores de densidade óptica obtidos (absorbância), a viabilidade relativa (%) foi determinada pela comparação entre a média do tratamento com a média do controle negativo: $Viabilidade(\%) = 100 \times (Abs(amostra)/Abs(controle\ negativo))$.

3.4.2.d.II. Resistividade elétrica

As medidas de resistividade elétrica (RE) medem a resistência de uma corrente elétrica ao passar por um tecido e são usadas para verificar a função barreira. Para tal, as peles foram retiradas das gradinhas de metal, em que são maturadas na interface ar-líquido, no 11º dia de cultura, e posicionadas com a epiderme para cima sobre insertos de poliéster *Transwell* (12 mm Transwell® 0.4 µm Polyester Membrane Insert, 3460,

Corning, NY, EUA). Sobre as peles também foi adicionado um tubo de borracha com 0,5 cm de diâmetro para isolar a corrente a passar somente pelo tecido. O interior do tubo de borracha e a parte de baixo do inserto inserido na placa de 12 poços foram preenchidos com tampão PBS e equipados com eletrodos Ag/AgCl conectados a um gerador de sinal Keysight 33220A (Agilent Technologies, Barueri, São Paulo, Brasil) e um multímetro digital ET-2053DMM (Minipa, São Paulo, Brasil), respectivamente. Então, foi aplicada uma corrente alternada a 100 mV (rms) e frequência de 10 Hz para avaliação de resistividade. A corrente elétrica gerada foi medida pelo multímetro, possibilitando o cálculo da RE conforme a primeira lei de Ohm: $RE = (\Delta P/I)/A$ onde, ΔP é a diferença de potencial do sistema (mV), I é a corrente medida (μA) e A é a área (cm^2). A amostra medida foi de 6 peles por grupo, totalizando 30 medidas.

3.4.2.e. Teste de irritação aguda

3.4.2.e.I. Teste de irritação aguda com SDS

O ensaio de irritação aguda foi usado para avaliar os modelos de pele normal e pele tricamada adaptado do teste de irritação descrito no guia OECD nº439 (Bagatin et al., 2023). Segundo este, a irritação cutânea se refere ao dano reversível que ocorre na pele após a exposição às substâncias químicas e sua subsequente recuperação. Assim, o princípio do método avalia a viabilidade celular após incubação por 42 horas da aplicação de substâncias de capacidade de irritação conhecidas, usando o ensaio colorimétrico com MTT, como descrito anteriormente. Porém, para este teste de irritação aguda, foi selecionada a concentração de SDS que poderia reduzir a viabilidade celular dos modelos de pele em 50% (IC50). Para esta determinação foi realizado um teste piloto usando 12 peles tricamada expostas em duplicata ao SDS nas concentrações de 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,75%, 0% (controle) por 15 minutos. Após 24h, essas foram extensamente lavadas com PBS e a viabilidade celular foi verificada com incubação de 3 horas com MTT, seguido de sua extração com isopropanol por 2 horas e leitura da absorbância a 570m. O resultado deste teste indicou que o IC50 para as peles tricamada seria de 1,2%, assim as concentrações selecionadas para este teste de irritação foram de 2,5% e 0,7%. Assim, a amostra usada para este experimento foi de uma duplicata de peles para cada concentração (3) e cada grupo (5), totalizando 30 peles, 18 do grupo pele tricamada e 12 do grupo pele normal.

Às peles foram adicionadas 30 µl das concentrações de SDS ou com a adição apenas de PBS (0%, grupo controle) por um tempo de exposição de 15 minutos. Após a exposição, as epidermes foram lavadas 20 vezes com PBS e mantidas em incubadora por 42 horas com meio de cultura RAFT a 37°C e 5% de CO₂, para sua recuperação. Então, o ensaio de viabilidade foi iniciado ao incubar as epidermes em 600 µl de MTT (1mg/ml) por 3 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o excesso de MTT foi removido por lavagens com PBS e as epidermes foram transferidas para uma placa de 12 poços com 2 ml de isopropanol sob agitação por 2 horas. Após homogeneizar a solução, alíquotas de 200µl em triplicata foram transferidas para placa de ELISA junto ao branco (Isopropanol) e avaliadas pelo espectrofotômetro Synergy HT- Biotek Multiplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT – Estados Unidos), leitura a 570nm. A partir dos valores de densidade óptica obtidos (absorbância), a viabilidade relativa (%) foi determinada pela comparação entre a média do tratamento com a média do controle negativo: Viabilidade (%) = 100×(Abs(amostra)/Abs(controle negativo)).

3.4.2.e.II. Quantificação de citocinas inflamatórias 42h

A interleucina 1 alfa (IL-1 α) e interleucina 6 (IL-8) foram quantificadas a partir do sobrenadante de cultura de 42h coletado após a exposição às concentrações de SDS por meio de um ensaio imunoenzimático padrão (Human IL-1 alpha/IL-1F1 DuoSet ELISA DY200e Human e Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA DY208, R&D Systems, Minnesota, EUA) de acordo com as instruções do fabricante Todas as medições foram realizadas em duplicata para cada produto químico de referência aplicado à epiderme em triplicata. A densidade óptica em 450 nm das amostras foi determinada usando o leitor de microplacas Synergy™ HT (Biotek Instruments, EUA). O cálculo dos resultados foi realizado pela interpolação dos valores de densidade óptica a partir de uma curva linear padrão variando de 7,81 – 500 pg/mL (IL1- α) e 31,25 – 2000pg/ml (IL-8), R²=0,98 (média) a partir de 3 leituras de placas individuais.

3.5. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental, portanto em cada experimento pelo menos 2 peles foram usadas para testar a hipótese em cada grupo, incluindo os grupos controle (pele normal). Os grupos de pele tricamada (A, B e C) representam distintas populações celulares, que apresentam variabilidades individuais

dos pacientes de origem, sendo essas consideradas como diferentes replicatas biológicas. A comparação dos dados das metodologias de pele normal e pele tricamada foram analisadas usando o modelo linear generalizado de análise de variância (ANOVA) para mais de duas variáveis, com teste *post-hoc* de comparação múltipla de Bonferroni. Para comparar as metodologias de pele tricamada com as peles completas em uma variável foram realizados testes t individuais, com alfa definido em 0,05 usando IBM® Software SPSS® Statistics (IBM Corporation©, EUA) e GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

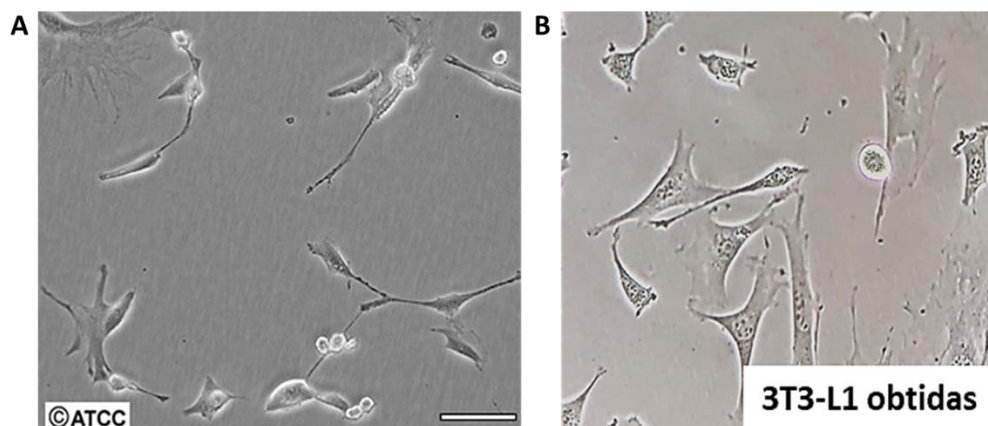
4.1. Cultura celular

4.1.1. Obtenção das células 3T3-L1 e diferenciação celular dos pré-adipócitos a adipócitos

Enquanto a aprovação do comitê de ética em pesquisa ainda estava sob análise e a coleta de amostras de células mesenquimais multipotentes para se completar 6 pacientes se estendeu durante a pandemia pelo medo generalizado da população em relação a hospitais e centros de cirurgia plástica, as células 3T3-L1 foram usadas para o estudo das características dos pré-adipócitos e definição do protocolo de indução adipogênica a serem usados posteriormente nas células estromais mesenquimais multipotentes obtidas a partir de amostras de tecido adiposo humano.

As células 3T3-L1 foram doadas pelo Prof. Ubiratan Fabres Machado do Instituto de Ciências Biomédicas, as quais ele adquiriu na ATCC sediada no Rio de Janeiro. Conforme a referência da ATCC mostradas na Figura 2, pode se observar que as células obtidas apresentam a mesma morfologia fibroblastóide.

Figura 2. Morfologia de (A) células 3T3-L1 da referência ATCC e (B) da cultura das células 3T3-L1 adquiridas em cultura em microscópio óptico.



4.1.1.1. Diferenciação celular dos pré-adipócitos a adipócitos

As células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar a adipócitos *in vitro* para o estabelecimento do melhor método de diferenciação com base na revisão bibliográfica para células humanas (hASCs – *human adipocyte stromal cells*) e murinas (3T3-L1), conforme a Tabela 2. Assim, foi feito uma análise de literatura e comparação dos meios de cultura para definição do mais adequado.

Os meios para a indução adipogênica dos pré-adipócitos 3T3-L1 usados neste projeto variaram nas concentrações de insulina, adição de Rosiglitazona (agonista do PPAR- γ) e de acordo com o tempo de cultura. Além disso, o meio de diferenciação também deve conter dexametasona, isobutilmetilxantina, sem a presença do SFB. Na presença deste meio, a maturação dos adipócitos ocorre em 7-14 dias.

A rosiglitazona é um medicamento da classe das tiazolidinedionas, destinado ao tratamento da diabetes mellitus, porém foi removido do mercado por seus efeitos colaterais cardiovasculares. Este induz a diferenciação adipogênica por ser um agonista que se liga no receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR- γ) e torna a célula mais responsiva à insulina, o que permite a entrada de maiores quantidades de glicose e ativação da via gliconeogênica.

A presença de SFB durante a diferenciação adipogênica é controversa na literatura. A presença do SFB pode gerar células com diferentes fenótipos, metabolismo e até mesmo a inibição da diferenciação, mesmo concentrações de 3% de SFB (Lee et al., 2012).

Tabela 2. Meios de expansão e diferenciação celular usados em pré- adipócitos 3T3-L1 e células mesênquimas estromais multipotentes (hASCs).

Célula	Meio de expansão	Meio de diferenciação (tempo de indução)	Referência
hASCs isolados	α -MEM, 10% SFB	DMEM/Ham F12, 0.5 mM IBMX, 100 nM insulina, 100 nM Dexametasona, 10 μ g/ml transferrina, 1 μ M rosiglitazona, 33 μ M biotina	Lee et al, 2012.
hASCs isolados	DMEM:Ham's F12, 10% CS (calf serum)	(3 dias) DMEM:Ham's F12, 1 uM dexametasona, 0.5 mM IBMX, 0.1 U/mL insulina, 1 uM indometacina	Turner, 2017.
hASCs isolados	α -MEM + 10% FCS	(3 dias) α MEM + 2% FCS, 1 μ M Dexametasona, 60 μ M indometacina, 2 μ M Rosiglitazona, 5 μ g/mL Insulina, 450 μ M IBMX	Muller et al, 2019
hASCs isolados	DMEM 10% de SFB	(3 dias) DMEM, 250 uM Dexametasona; 2 uM Rosiglitazona; 0,5mM IBMX; 10 ug/ml insulina	Gojanovich et al, 2018
3T3-L1	10% NCS, DMEM	(2 dias) 10% FBS, 0,25uM Dexametasona, 0,5uM IBMX, 1ug/ml insulina, Rosiglitazone 2uM	Zebisch et al. 2012
3T3-L1	10 % CS, DMEM	(3 dias) DMEM 10% FBS, 1uM Dexametasona, 0,5 uM IBMX, 0,1 U/ml insulina.	Turner et al., 2015
3T3-L1	DMEM + 10% SFB	(3 dias) DMEM/F12 HAM + 10% SFB, 0.2 mM IBMX, 10 μ M rosiglitazona, 1 μ M dexametasona, 10 μ g/ml insulina	Zoico et al., 2018

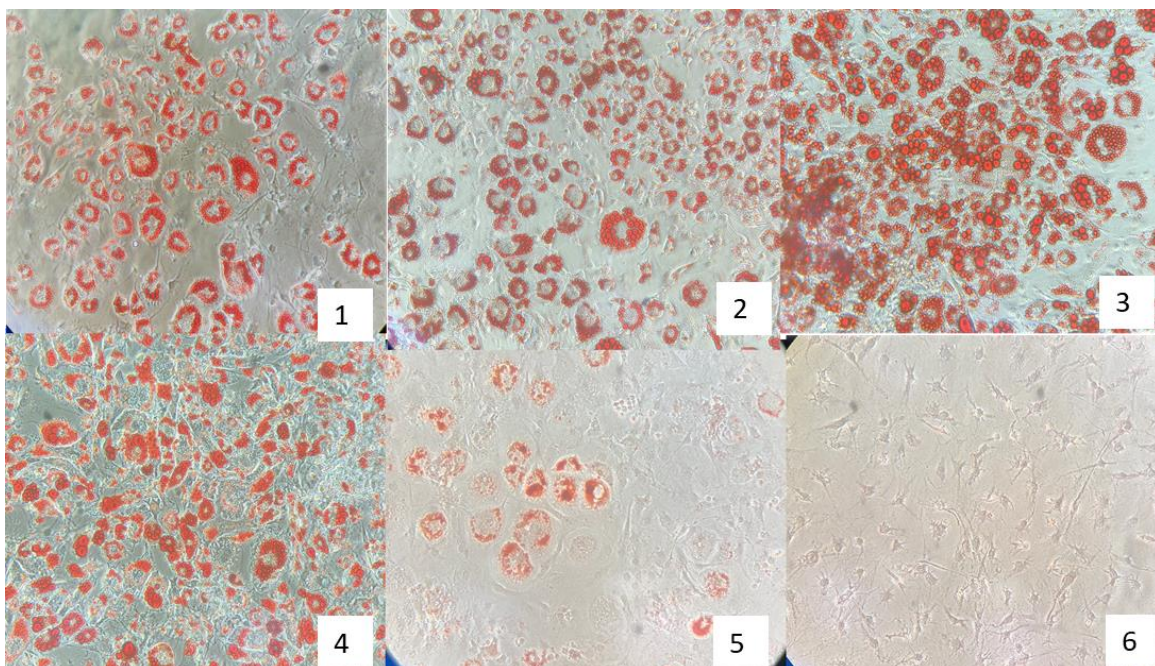
Legenda: hASCs – *human adipocyte stem cells*; α -MEM – *α -minimum essential serum*; SFB – soro fetal bovino; IBMX- isobultimetilxantina; FCS – *fetal calf sérum*; NCS - *newborn calf sérum*.

Para avaliar a maturação celular as células 3T3-L1 foram coradas com Oil Red O, este corante hidrofóbico se liga em triglicerídeos neutros (triacilglicerol, diacilglicerol) e ésteres de colesterol, que são produzidos somente quando adipócitos estão em seu estado final de diferenciação. Neste, a via gliconeogênica ativada leva ao acúmulo de lipídeos intracelulares, que podem ser visualizados em microscópio óptico (Mehlem et al., 2013).

Durante a diferenciação adipogênica pode se observar que os pré-adipócitos aumentam em número e tamanho das gotículas de lipídeos intracelulares.

Os meios de diferenciação usados para a indução adipogênica dos pré-adipócitos variaram nas concentrações de insulina, adição de Rosiglitazona e de acordo com o tempo do meio de indução adipogênica, divididos nos seguintes grupos, mostrados na Figura 3.

Figura 3. Comparação da diferenciação de células 3T3-L1 após 10 dias de cultura de 6 grupos distintos de meio de indução adipogênica corados com Oil Red O em microscópio óptico (aumento de 10x).



Legenda: 1. Meio de diferenciação básico – mantidos por 48h em cultura; 2. Meio básico com mais insulina – mantidos por 48h em cultura; 3. Meio básico com rosiglitazona – mantidos por 48h em cultura; 4. Meio básico com rosiglitazona e mais insulina – mantidos por 48h em cultura; 5. Meio básico – 96 horas (4 dias) de indução adipogênica; 6. Sem meio de diferenciação (grupo controle).

A partir da Figura 3, pode se observar que os meios 3 e 4 induziram a um maior acúmulo de lipídeos intracelulares pela quantidade e tamanho das gotículas de lipídeos neutros marcadas pelo Oil Red O, o que pode ser associado à adição de rosiglitazona. De acordo com Wabish et al. (2001) e Zebisch et al. (2012) a concentração de rosiglitazona e outras tiazolidinedionas estimula a diferenciação adipogênica de forma dose-dependente, com concentração máxima de ação a 2 μ M.

Apesar de o grupo 4 conter uma concentração de insulina 10 vezes maior que a do grupo 3, esta não parece fazer diferença na diferenciação dos adipócitos, já que é observável que o grupo 3 apresenta maior quantidade e tamanho de gotículas lipídicas acumuladas.

O grupo 5 foi o grupo que recebeu o meio de diferenciação pelo maior período (4 dias), porém este não se apresenta corado em vermelho. Levanto a hipótese de este ter sido o grupo de maior diferenciação celular, pois assim como os adipócitos maduros, as células podem ter perdido sua capacidade de aderência à placa de cultura, e se tornaram mais frágeis em relação aos outros grupos. Provavelmente, no momento das lavagens anteriores à adição do corante, parte das células se destacaram da placa e foram descartadas. Esse resultado poderia estar de acordo com os descritos por Lee e colaboradores (2012), no qual a qualidade da diferenciação dos adipócitos é proporcional ao tempo de cultura contendo o meio de diferenciação, o que poderia tornar estas células mais frágeis.

O grupo 6, grupo controle, ao qual foi adicionado apenas DMEM, não apresentou nenhuma diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1, confirmando a qualidade das diferenciações e a maturação dos adipócitos.

Assim, o meio 3, que contém isobutilmetilxantina 0,5mM, dexametasona 1uM; rosiglitazona 2uM e insulina 5ug/ml, por um tempo de indução maior que 48 h, como no meio 5, parece ser o mais favorável para a indução adipogênica das células mesenquimais multipotentes humanas isoladas, já que, de acordo com Lee e colaboradores (2012), diferentemente das células murinas, as humanas necessitam do uso de tiazolidinedionas para a maturação das células mesenquimais multipotentes em adipócitos.

Portanto, o meio de indução selecionado usando os experimentos com células murinas foi utilizado nas etapas com células primárias humanas, fazendo com que as células pré-adipócitas se diferenciem, de acordo com a literatura.

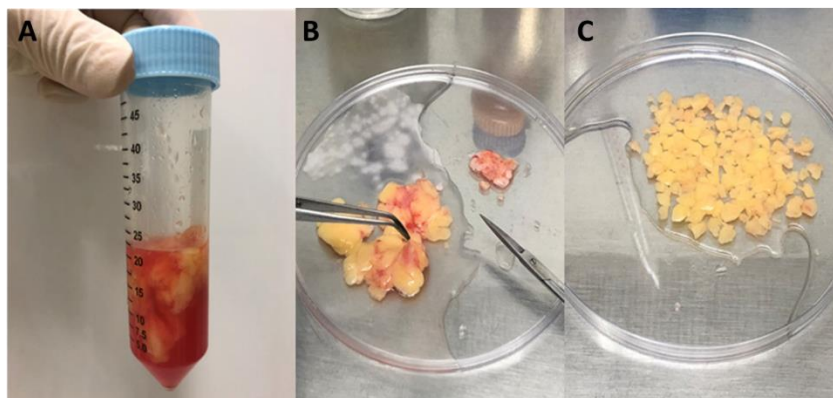
4.1.2. Isolamento das células estromais mesenquimais multipotentes

O isolamento de adipócitos humanos a partir das amostras de pele doadas de excesso cirúrgico apresentam desafios na sua cultura em monocamada. Nestas condições não fisiológicas, que apresentam um ambiente hiperóxico em relação ao tecido adiposo

de origem, estas células reagem com grande estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, no tecido adiposo, os adipócitos se encontram no estado final de diferenciação, que não apresenta capacidade de renovação e não apresenta moléculas de adesão nas placas de cultura (Nicu et al., 2018).

Assim, a cultura de adipócitos humanos *in vitro* só é possível pela obtenção das denominadas células estromais mesenquimais multipotentes, que são as células de origem dos adipócitos e são abundantemente encontradas no tecido adiposo. Estas são células aderentes às placas de cultura, capazes de expandir, aumentar seu número de passagens, e serem criopreservadas. As células estromais multipotentes encontram-se em um estado indiferenciado com características fibroblastóides, com capacidade de serem induzidas *in vitro* para os seguintes tipos celulares: condrócitos, osteócitos ou adipócitos, dependendo do meio de diferenciação usado. Assim que diferenciadas elas apresentam as características genuínas dos adipócitos do tecido de origem (Palumbo et al., 2018).

Figura 4. Etapas do isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes a partir de amostras de tecido adiposo abdominal.



Legenda: A- Tubo contendo o tecido adiposo abdominal em soro fisiológico; B- Remoção do tecido conectivo e vasos; C – Fragmentação do tecido.

O protocolo de isolamento das células estromais mesenquimais pluripotentes foi baseado nos estudos de Lee e colaboradores (2012), Gojanovich e colaboradores (2018) e Zhu e colaboradores (2013). Após a metodologia ser estudada e obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes envolvidos na pesquisa, as amostras excedentes cirúrgicas de 6 pacientes foram obtidas e usadas para extrair as células mesenquimais multipotentes, conforme descrito na Tabela 3.

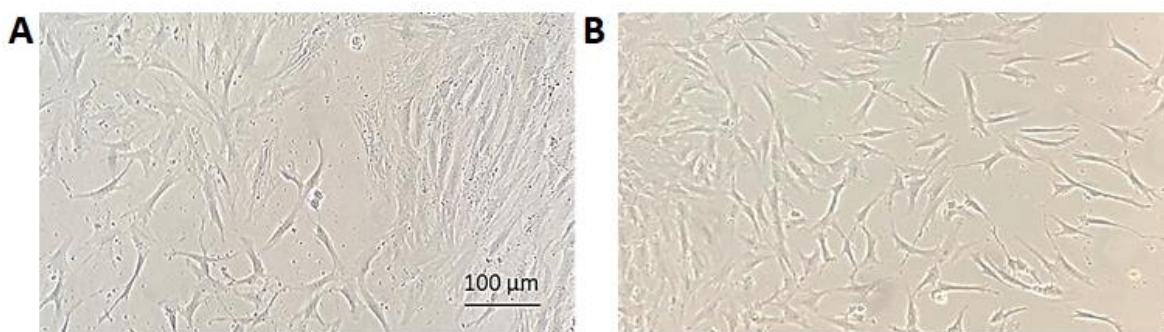
Tabela 3. Lista de pacientes doadores de amostras de lipoaspiração ou tecido adiposo para o isolamento de células estromais multipotentes.

Código	Sexo	Idade	Data do isolamento
#1	Feminino	38 anos	25/11/2020
#2	Feminino	38 anos	03/07/2021
#3	Feminino	39 anos	14/07/2021
#4	Feminino	32 anos	05/08/2021
#5	Feminino	55 anos	01/09/2021
#6	Masculino	39 anos	21/10/2021

Para cada forma de amostra obtida, entre lipoaspiração ou o tecido adiposo subcutâneo, um protocolo distinto foi estabelecido, que se diferem principalmente nas etapas prévias à digestão enzimática. Após a centrifugação das amostras, quatro fases distintas são observáveis (Figura 1 - Métodos), a fase sobrenadante que contém os adipócitos maduros é a de interesse. Pela menor densidade do tecido adiposo, as etapas de lavagem visam o descarte da fração oleosa acima do tecido adiposo, formada por gotículas de óleo e gordura, e da fração inferior aquosa formada por líquido, restos de tecido e sangue sedimentados no fundo do tubo.

Pode-se observar a partir da Figura 5, que as células mesenquimais estromais pluripotentes apresentam morfologia fibroblastóide característica desse tipo de célula, como apresentado também pelas células 3T3-L1.

Figura 5. Células estromais mesenquimais humanas multipotentes isoladas, observadas em microscópio óptico (aumento de 10x) obtidas a partir de amostras de tecido adiposo (A) e de lipoaspiração (B).



4.1.2.1. Caracterização de fenótipo celular das células isoladas por citometria de fluxo

A partir das células isoladas, precisamos caracterizá-las como células mesenquimais multipotentes do tecido adiposo para a fenotipagem destas quanto a um painel de marcadores de superfície celular sugeridos pela ISTC (2006), seguindo o protocolo para extração de células mesenquimais multipotentes descrito por Gojanovich e colaboradores (2018).

As células dos pacientes #1 a #6 foram submetidas a citometria de fluxo para caracterização do fenótipo celular e todas foram caracterizadas com alta pureza como células mesenquimais multipotentes humanas do tecido adiposo.

Figura 6. Dot plot da marcação tripla com os anticorpos positivos anti-CD90, CD105 e CD73 e complexidade interna das células dos pacientes (#1 a #6) em singlet por citometria de fluxo.

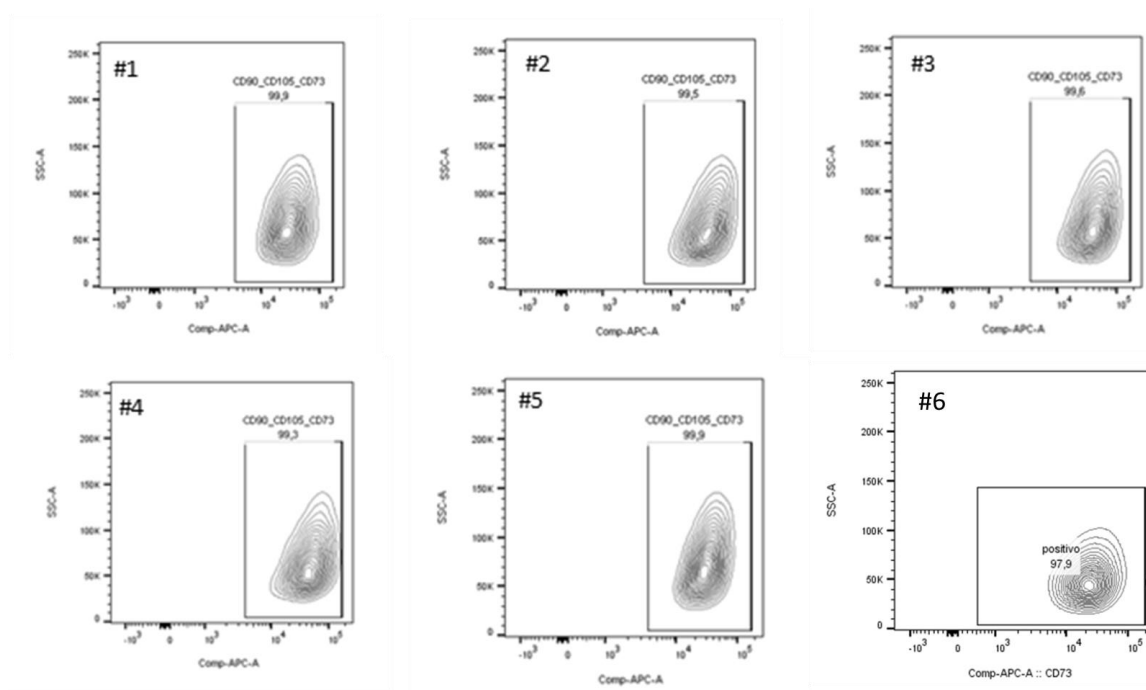


Tabela 4. Resultado resumo da marcação positiva tripla para os anticorpos do coquetel positivo (CD90, CD105 e CD73) e marcação negativa para os anticorpos do coquetel negativo (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR) com isotipo correspondente.

Código do paciente	Positivo para CD90/CD105/CD73	Negativo para CD34/CD11B/CD19/CD45
#1	99,9 %	99,8 %
#2	99,5 %	99,9 %

#3	99,6 %	99,8 %
#4	99,3 %	99,9 %
#5	99,9 %	99,8 %
#6	97,9%	95,9%

O coquetel negativo apresenta marcações distintas características de células em estágio avançado de diferenciação como: as células sanguíneas (CD34), macrófagos (CD11b), linfócitos (CD19) e leucócitos (CD45, HLA-DR). Assim, as células mesenquimais multipotentes não podem apresentar nenhuma desses marcadores superficiais, que os caracterizariam como uma contaminação por esses tipos celulares.

De acordo com os resultados demonstrados no gráfico e na tabela podemos ver a característica pura das células mesenquimais multipotentes humanas isoladas a partir do tecido adiposo, já que a marcação superficial dos anticorpos CD90, CD105 e CD73 foram maiores que 97% em todas as amostras. Assim, o protocolo de isolamento dessas células a partir dos excessos cirúrgicos de lipoaspiração foi estabelecido com sucesso. A partir da caracterização das células primárias obtidas, os objetivos de estabelecer uma hipoderme humana *in vitro* foram desenvolvidos.

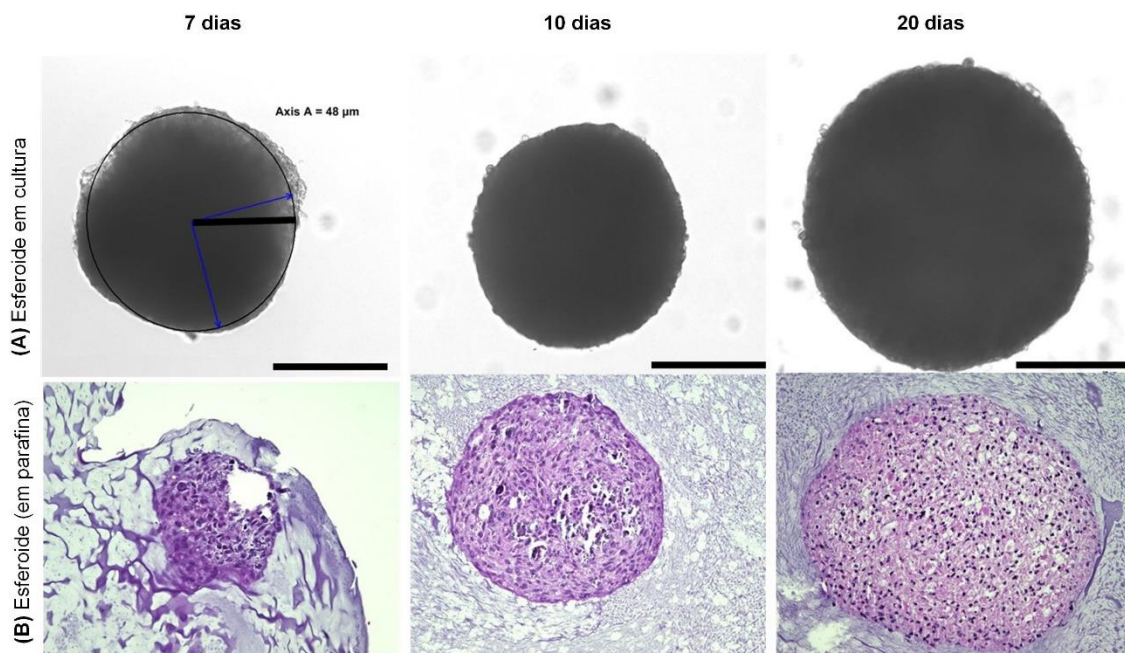
4.2. Desenvolvimento do protocolo de pele tricamada

4.2.1. Construção de esferoides

Os esferoides foram construídos a partir de células mesenquimais multipotentes (Figura 7) e foram mantidos em cultura para a diferenciação adipogênica no período de 7, 10 e 20 dias. Pode ser observado na Figura 8A que conforme avança o tempo de cultura, um formato mais esférico é formado, chegando até aproximadamente 100 µm de diâmetro no dia 20 da cultura.

Na Figura 7B, se observa a histologia com coloração de hematoxilina e eosina, na qual conseguimos distinguir o formato esférico das construções *in vitro* e distinguir os espaços característicos vazios quando o conteúdo lipídico dos adipócitos é extravasado pela extração dos lipídios por solventes orgânicos durante a desidratação das amostras (Vermette et al., 2007).

Figura 7. Caracterização dos esferoides mantidos em cultura de meio de diferenciação até 20 dias.



Legenda: (A) Fotografia dos esferoides em cultura, (B) Fotomicrografia das seções verticais de parafina após análise histológica (coradas com hematoxilina e eosina. Barra= 50 μ m).

4.2.2. Desenvolvimento e Caracterização da pele tricamada *in vitro*

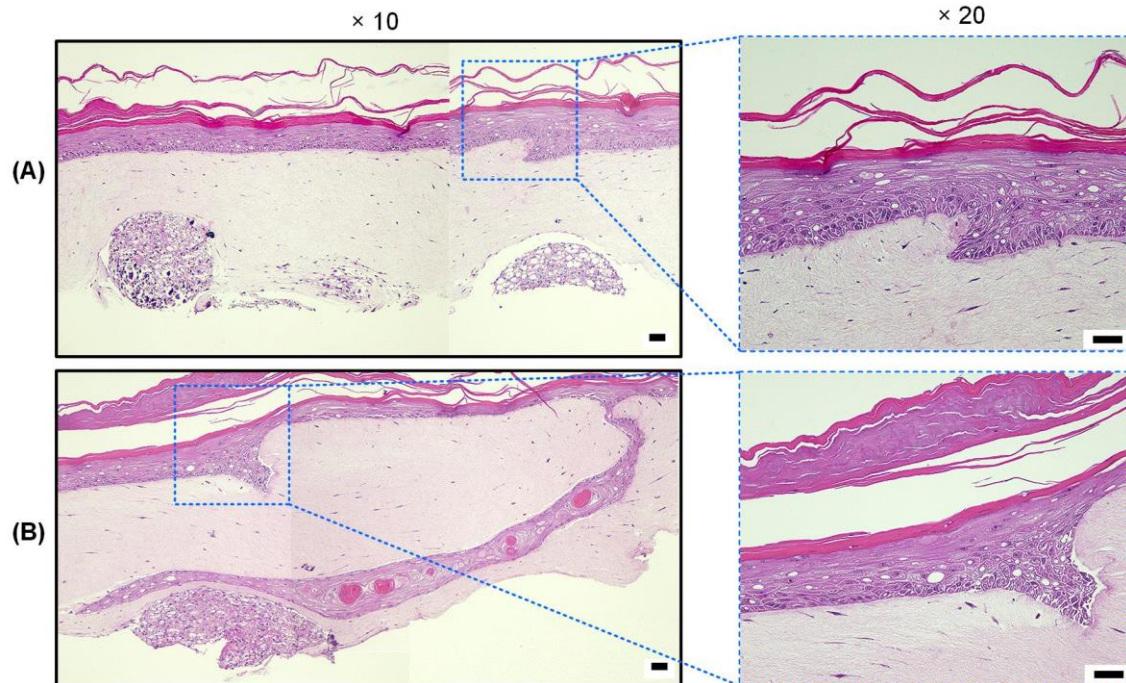
Modelos mais complexos e representativos da pele humana *in vivo* são de grande interesse para as indústrias cosméticas e farmacêuticas para a obtenção de plataformas de testes pré-clínicos confiáveis. Porém, ao ampliar a representatividade da pele humana com a incorporação de novos tipos celulares, como os adipócitos, o desafio e o estabelecimento dos protocolos para sua obtenção se tornam proporcionalmente mais desafiadores.

Para representar um modelo de pele tricamada, as células representativas de cada região da pele foram selecionadas. Na epiderme, os queratinócitos devem se diferenciar e estratificar, formando desde a camada basal ao estrato córneo. A derme deve conter uma matriz de colágeno com fibroblastos. A hipoderme deve conter, em matriz de colágeno, adipócitos diferenciados capazes de armazenar lipídeos. Assim a construção de um modelo de pele tricamada deve conter essas características.

A partir da Figura 8, podemos ver as construções de pele tricamada obtidas a partir dos protocolos estudados. Ambos os protocolos exibem uma diferenciação da camada epidérmica adequada, assim como as características esperadas para a matriz dérmica. A

regiões epiteliais estão morfológicamente distintas em três partes, ambos produtos contêm esferoides na região inferior da derme e possuem queratinócitos diferenciados com presença de estrato córneo. A figura 8A mostra uma epiderme morfológicamente mais bem estruturada quando comparada a pele produzida pelo protocolo II (Figura 8B).

Figura 8. Fotomicrografias de histologia (coloração de hematoxilina e eosina) de pele normal com adipócitos.



Legenda: (A) Pele tricamada com protocolo I (tricamada junto), (B) Pele tricamada com protocolo II (tricamada separada). Imagens de aumento 10 e 20x. Barra= 100 μ m

Assim, o protocolo I foi considerado melhor para representar *in vitro* a reprodução de um modelo de pele que contém epiderme, com os queratinócitos diferenciados e estratificados, a derme com os fibroblastos e a camada hipodérmica, representada pelos esferóides com adipócitos diferenciados, com aparente acúmulo lipídico, a partir de seus progenitores de células mesenquimais multipotentes.

4.2.3. Imunohistoquímica da construção da pele tricamada *in vitro*

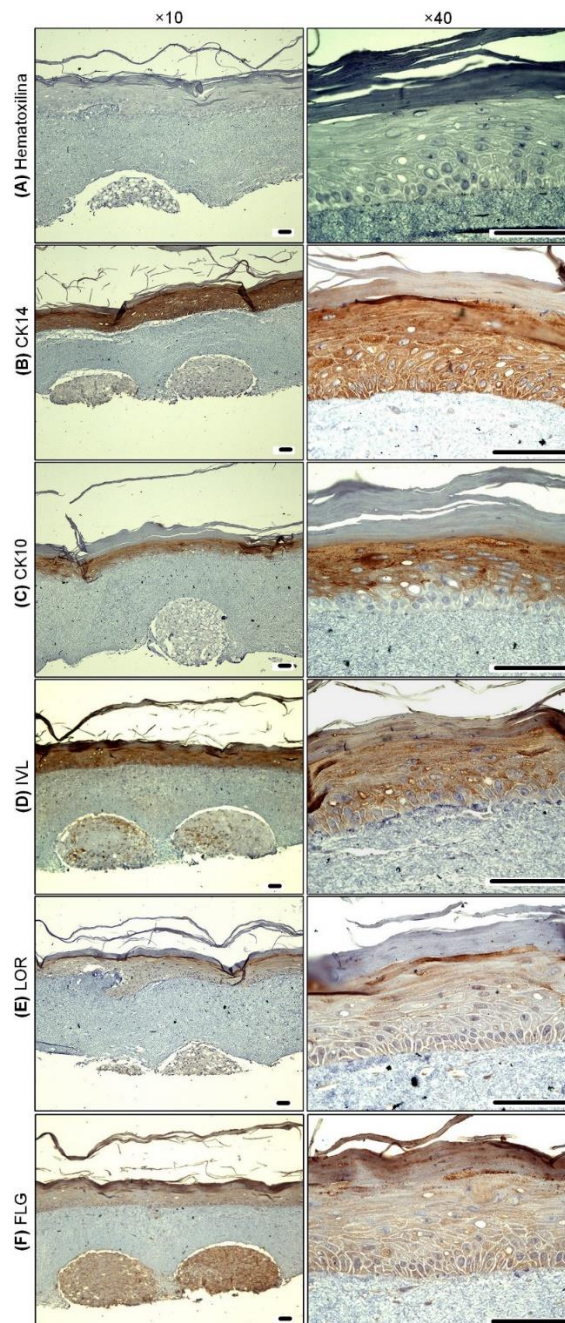
As características de estratificação da pele obtida pelo protocolo I foi avaliada pela detecção de proteínas específicas expressas pelos queratinócitos no processo de diferenciação por imunohistoquímica.

Nas Figuras 9 a 12, observam-se as imagens obtidas pela imunomarcação das proteínas expressas pelos queratinócitos no processo de diferenciação epidérmica. Enquanto as Figuras 10 e 12 revelam a marcação da expressão de adiponectina.

4.2.3.a. Pele tricamada obtida com o protocolo I

O mimético de pele *in vitro* obtido por este protocolo mostrou a expressão de proteínas basais e suprabasais como o CK14 (Figura 9 B) e CK10 (Figura 9 C), respectivamente. Assim como a expressão das proteínas relacionadas com a corneificação da epiderme, do estrato espinhoso até o córneo, como a involucrina (Figura 9 D), loricrina (Figura 9 E) e filagrina (Figura 9 F). A demonstração da expressão destas proteínas características da pele humana, confirmam o sucesso do processo de estratificação e diferenciação da parte epidérmica no modelo de pele tricamada.

Figura 9. Fotomicrografias de imunocoloração pele tricamada do protocolo I (método junto).

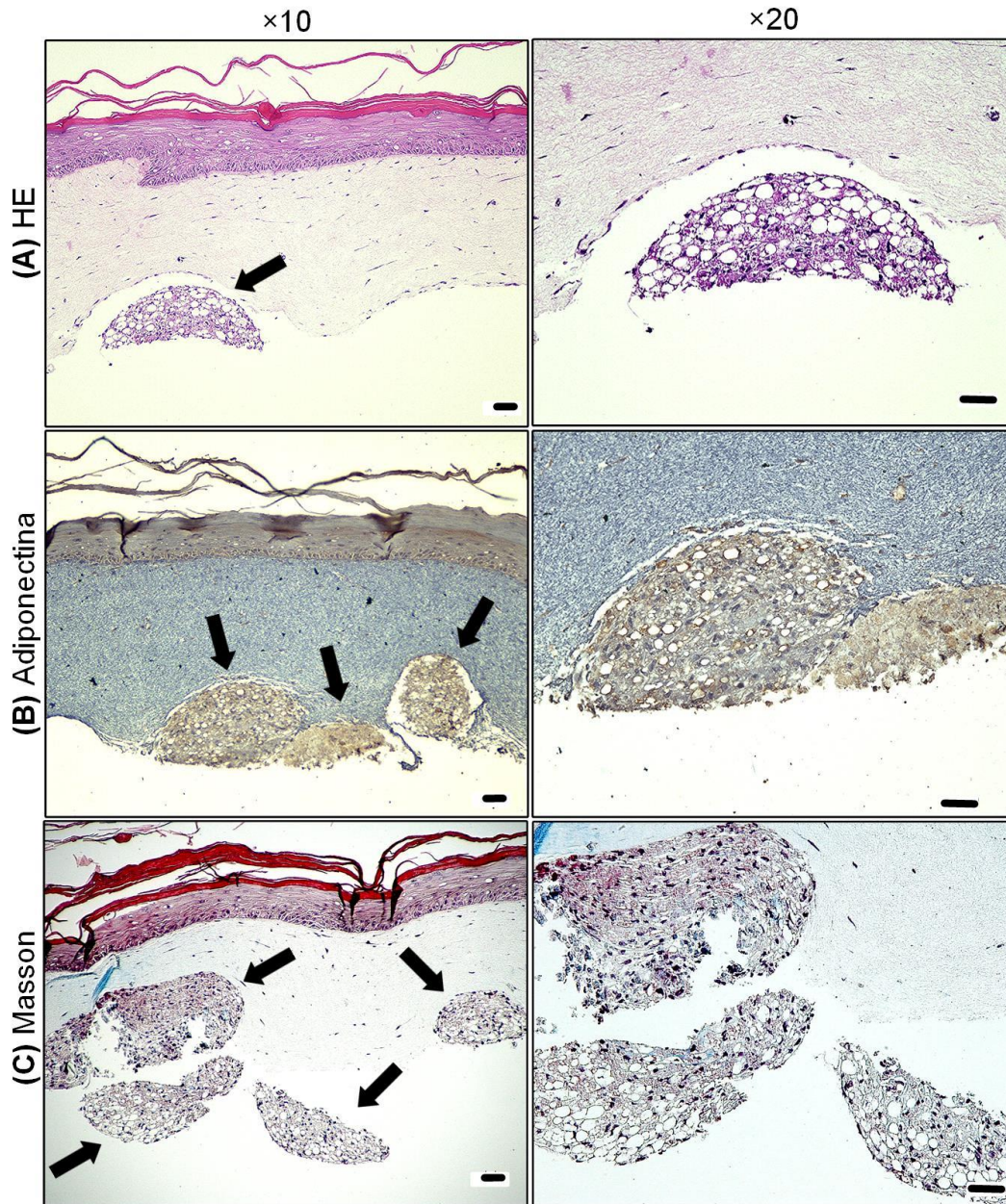


Legenda: (A) Branco: coloração com hematoxilina, (B) CK14: citoqueratina 14, (C) CK10: citoqueratina 10, (D) IVL: involucrina, (E) LOR: loricrina, (F) FLG: filagrina. Imagens com aumento de 10 (x10, esquerda) e 40 (x40, direita). Barra: 100 μ m.

Além disso, a presença de adiponectina é fundamental para verificar a diferenciação da camada hipodérmica, representada pelos esferóides diferenciados de adipócitos. Na análise morfológica a partir da histologia, Figura 10, podemos verificar que os esferóides de adipócitos estão diferenciados por apresentar seus vacúolos característicos de acumulação lipídica, extraída por solventes durante sua inclusão. Na

imuno-histoquímica apresentada na figura 10, a adiponectina também está marcada na camada epidérmica, indicando a provável relação entre a secreção de adiponectina pelos esferóides adiposos e a captação dos queratinócitos.

Figura 10. Fotomicrografias morfológicas das células adipócitas na pele in vitro - Protocolo I.



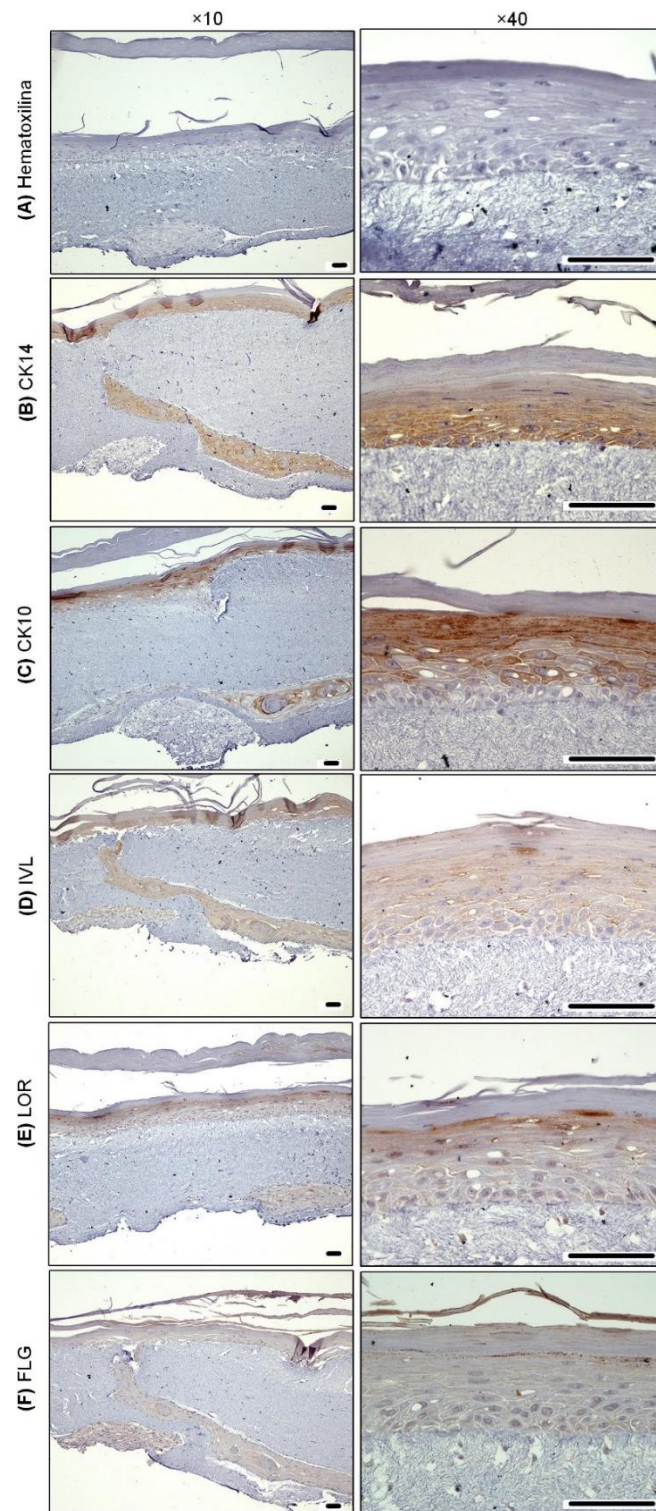
Legenda: (A) Marcação com hematoxilina e eosina, (B) imunocoloração de adiponectinas, (C) Coloração de tricromo Masson. Imagens com aumento de 10 da pele normal (x10, esquerda) e aumento de 20 dos esferóides com células adipócitas na pele (x20, direita). Barra: 100 μ m. Setas pretas sinalando a existência das células adipócitas na pele normal.

4.2.3.b. Pele tricamada obtida do protocolo II

Com este protocolo, também conseguimos demonstrar uma construção com expressão de proteínas basais e suprabasais como o CK14 (Figura 11B) e CK10 (Figura 11C), respectivamente. Assim como a expressão das proteínas relacionadas com a estratificação da epiderme, do estrato espinhoso até o córneo, como a involucrina (Figura 11 D), loricrina (Figura 11E) e filagrina (Figura 11F). A demonstração da expressão destas proteínas características da pele humana, confirmam o sucesso do processo de diferenciação da epiderme.

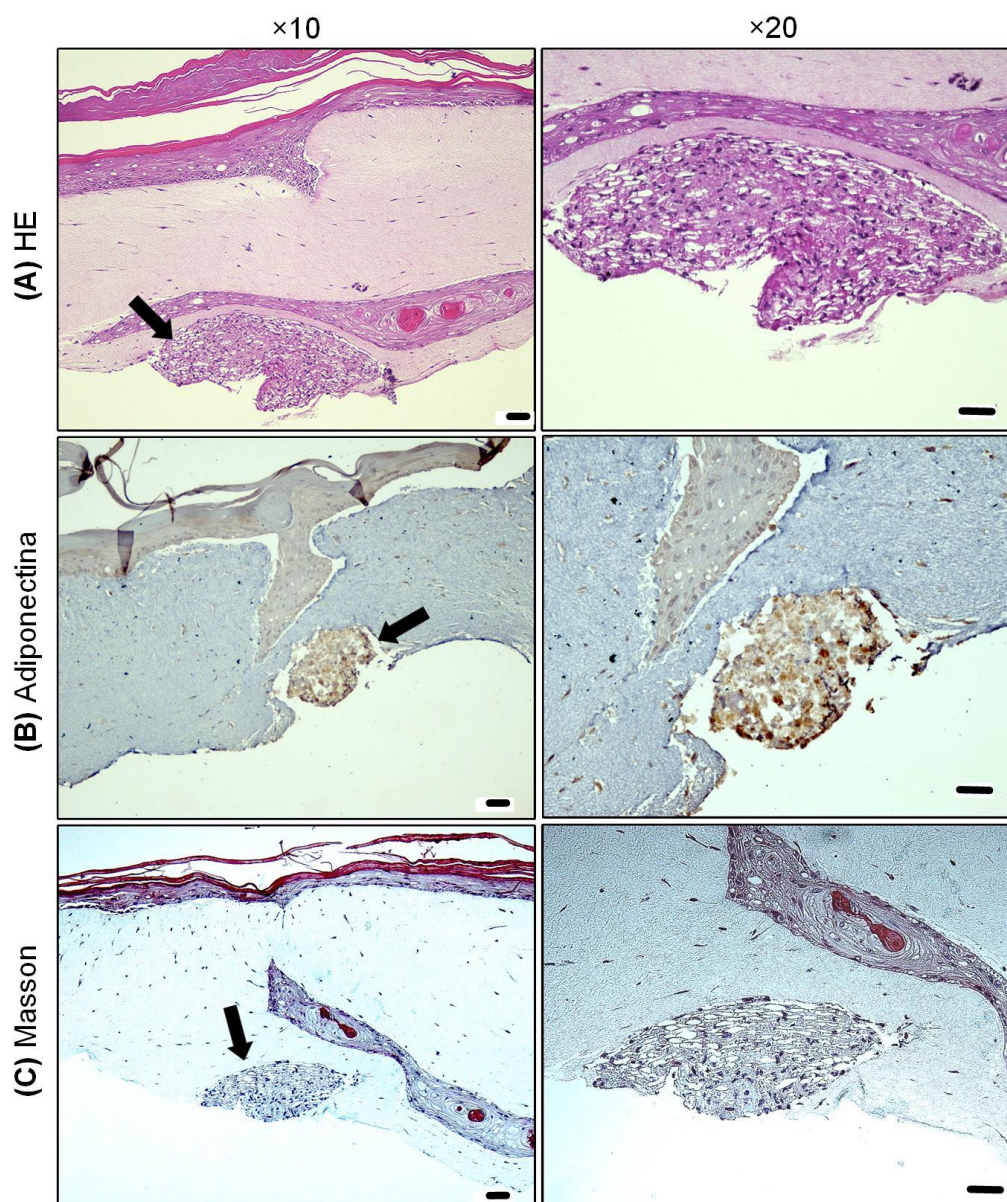
Na Figura 12 a partir da histologia, podemos dizer que a morfologia dos esferoides na construção da pele, apresentam características morfológicas semelhantes as mostradas na Figura 10, próprias da presença de célula diferenciadas como adipócitos. A interação entre a epiderme e a camada hipodérmica também pode ser observada na Figura 12B, pela expressão de adiponectina tanto na região do esferoide (setas pretas) como na região epidérmica.

Figura 11. Fotomicrografias de imunocoloração pele tricamada do protocolo II (método separado).



Legenda: (A) Branco: coloração com hematoxilina, (B) CK14: citoqueratina 14, (C) CK10: citoqueratina 10, (D) IVL: involucrina, (E) LOR: loricrina, (F) FLG: filagrina. Imagens com aumento de 10 (x10, esquerda) e 40 (x40, direita). Barra: 100 μ m.

Figura 12. Fotomicrografias morfológicas das células adipócitas na pele in vitro - Protocolo II.



Legenda: (A) Marcação com hematoxilina e eosina, (B) imunocoloração de adiponectinas, (C) Coloração de tricromo Masson. Imagens com aumento de 10 da pele normal (x10, esquerda) e aumento de 20 dos esferóides com células adipocitas na pele (x20, direita). Barra: 100 μ m. Setas pretas sinalando a existência dos esferóides de adipócitos na pele normal.

4.3. Comparação entre os modelos de pele tricamada e pele normal

A partir dos dois protocolos de modelos de pele tricamada desenvolvidos, o protocolo I, no qual a derme não é feita em duas etapas distintas de reticulação do colágeno (protocolo II), se demonstrou mais representativo no ponto de vista morfológico e estrutural para compor a pele tricamada. Assim, iniciou-se os experimentos para se responder a hipótese central desta tese: se a camada hipodérmica, representada pelos

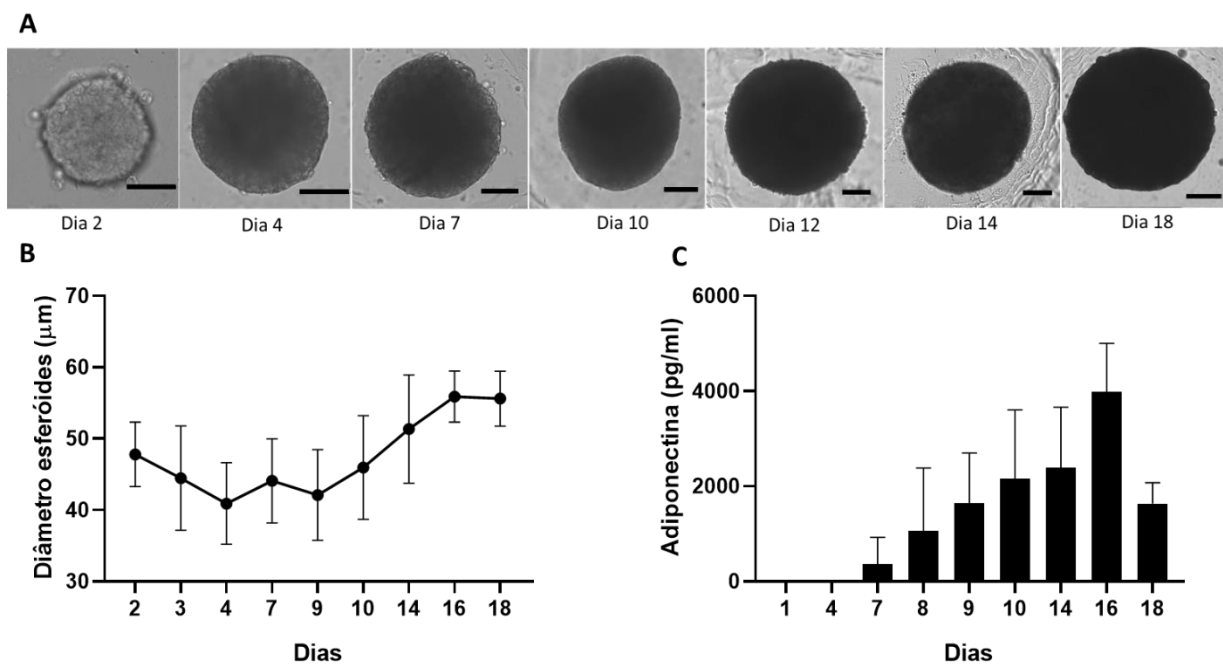
esferoides de adipócitos, poderia melhorar os modelos de pele reconstruídas *in vitro*. Então, este foi comparado com o modelo de pele chamada como “pele completa” ou “pele normal”, pois, dentre os modelos clássicos de pele humana reconstruídos *in vitro*, tradicionalmente, podemos trabalhar com o modelo que representa apenas a epiderme humana ou o modelo de pele que contém a epiderme e a derme, sendo chamado de modelo *full thickness* internacionalmente, e traduzido ao português como modelo de pele completa.

4.3.1. Esferoides de adipócitos

Os esferoides de adipócitos a serem adicionados nas peles tricamadas foram separados em três grupos distintos, nomeados como A, B e C, que representam populações diferentes de suas células primárias, construídos a partir da variação de dois pacientes diferentes na composição de cada grupo. Esta composição visa incluir nos experimentos a variabilidade interindividual das células primárias de forma a tentar aumentar a representatividade populacional.

O crescimento dos esferoides foi acompanhado pela medida de seu diâmetro durante os 18 dias em cultura, e fotos representativas deste crescimento podem ser observadas a seguir, na Figura 13. Além disso, a quantificação da secreção de adiponectina foi realizada para verificar a maturação dos adipócitos.

Figura 13. Microfotografias dos esferóides de adipócitos (A), medida do diâmetro dos esferóides (B) e secreção de adiponectina (C), conforme o tempo de cultura, em dias (barra= 20 μ m).



A adiponectina é uma das principais citocinas produzidas pelos adipócitos e é secretada ao meio extracelular apenas quando o adipócito atinge sua maturação, após a sua diferenciação a partir de sua célula progenitora, as células mesenquimais pluripotentes.

Conforme demonstrado na Figura 13 C, a secreção de adiponectina se inicia a partir do dia 7, o que indica que os adipócitos atingiram sua diferenciação e maturação, que se iniciou após a indução adipogênica com o meio de cultura contendo a suplementação com isobutilmetilxantina, dexametasona, rosiglitazona e aumentando a concentração de insulina.

Como descrito anteriormente, os adipócitos apresentam morfologia e biologia com maior correspondência ao *in vivo* quando cultivados na forma de adipócitos. Assim, os adipócitos caracterizados na figura anterior foram utilizados para compor a pele tricamada, após sua maturação e crescimento acompanhados, no 18º dia de sua dispersão celular. Após a inclusão destes na pele tricamada, a pele ainda é maturada por 11 dias até o início dos experimentos comparativos da pele tricamada com o modelo clássico de pele normal (bicamada), totalizando 29 dias dos esferóides de adipócitos.

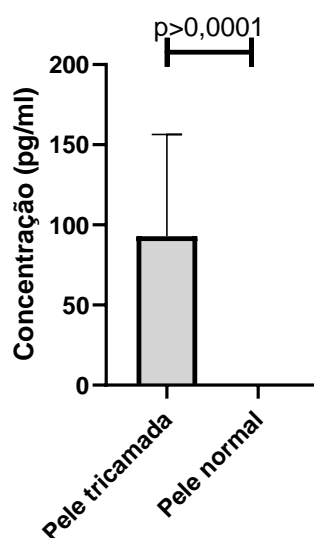
4.3.2. Comparação pele tricamada com pele normal

4.3.2.1. Secreção de Adiponectina

Para qualquer base de comparação entre a pele tricamada e a pele normal, a hipótese central desta tese é de que a presença da camada hipodérmica, representada pela presença de esferóides de adipócitos, através da secreção de adiponectina promove a comunicação com a epiderme, e assim, se observaria melhor função barreira da pele, menor inflamação e maior recuperação pós irritação quimicamente induzida.

Como podemos ver na Figura 14, através do sobrenadante da cultura, coletado no 11º dia de maturação das peles, não há secreção de adiponectina nas peles normais em comparação com as peles que contém os adipócitos.

Figura 14. Adiponectina secretada no meio de cultura no 11º dia pós-construção dos modelos de pele.

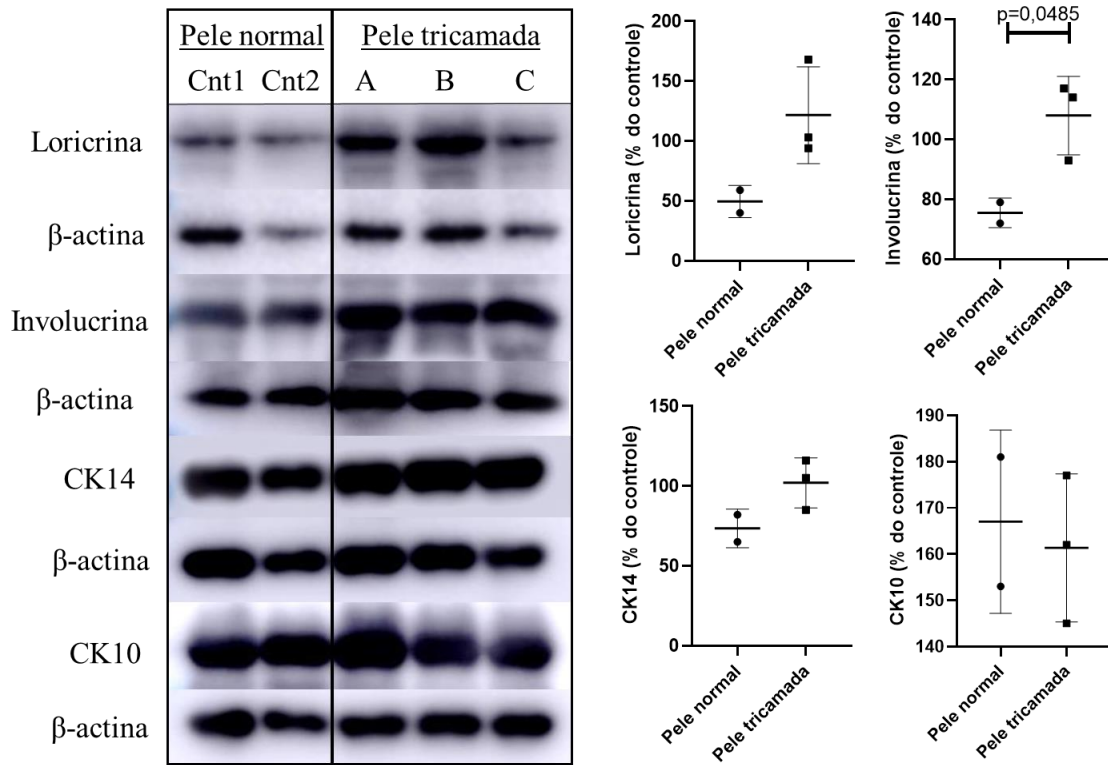


4.3.2.2. Expressão de proteínas por Western Blotting

A partir do Western Blotting podemos semi-quantificar a influência da pele tricamada na expressão de proteínas envolvidas na estratificação da epiderme e formação do estrato córneo.

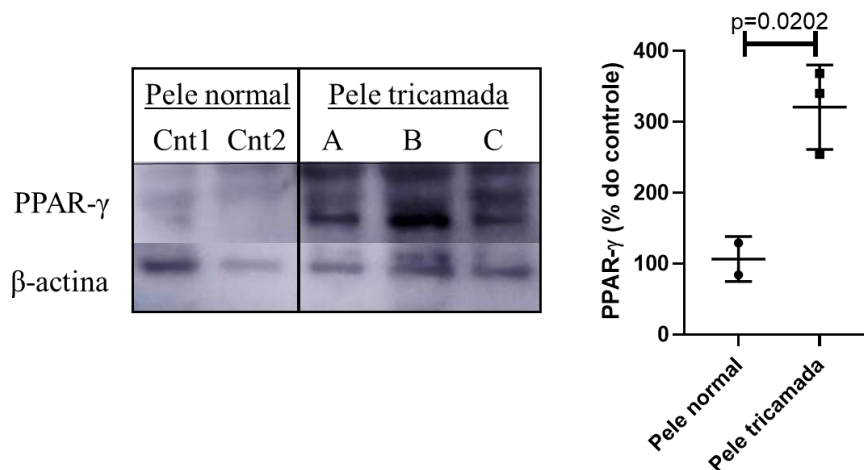
A partir da Figura 15, vemos que as proteínas envolvidas na formação do envelope córneo, loricrina e involucrina, estão aumentadas nas peles contendo os adipócitos, porém somente a involucrina apresenta diferença significativa ($p=0,0485$).

Figura 15. Expressão proteica de marcadores de estratificação e diferenciação epidérmica, citoqueratina 10 (CK10) e 14 (CK14), loricrina e involucrina por Western Blotting.



Além de verificar as proteínas envolvidas na composição e estratificação da epiderme, também foi analisada a expressão de PPAR- γ , o fator de transcrição chave do metabolismo, ativação e maturação dos adipócitos. Na Figura 16, podemos ver que os modelos de pele que não contém adipócitos apresentam expressão inferior de PPAR- γ em relação à pele tricamada.

Figura 16. Expressão proteica de PPAR- γ por Western Blotting.

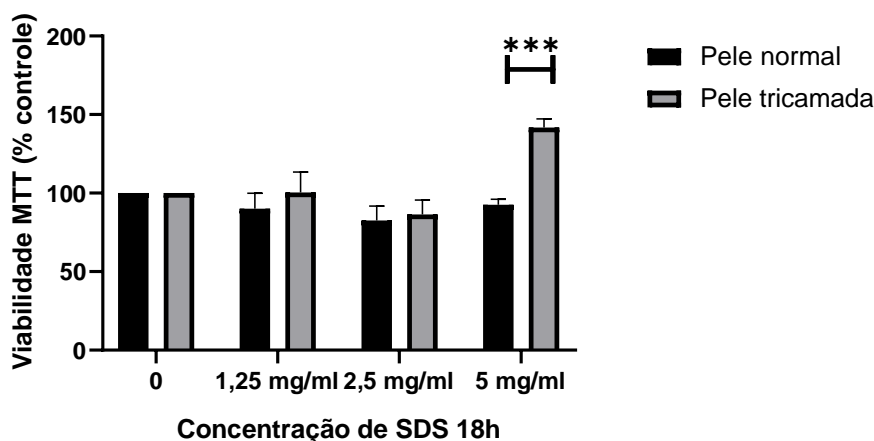


4.3.2.3. Função Barreira

Este experimento tem como objetivo a determinação da concentração que reduz a viabilidade celular em 50% após a aplicação de SDS com diferentes concentrações por 18h, este valor, chamado de IC50 pode ser então comparado entre modelos de pele para verificar o quanto a função barreira da pele está íntegra.

Podemos ver na Figura 17, que mesmo a maior concentração de SDS usada, não reduziu a viabilidade celular em ambos os modelos de pele. Inclusive, este na verdade resultou num aumento da viabilidade celular no modelo de pele tricamada. O que é compatível com os resultados observados em sequência, no teste de irritação aguda feito por SDS.

Figura 17. Avaliação da função barreira dos modelos de pele bicamada e tricamada. A viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações de SDS (0; 1,25; 2,5 e 5 mg/ml).

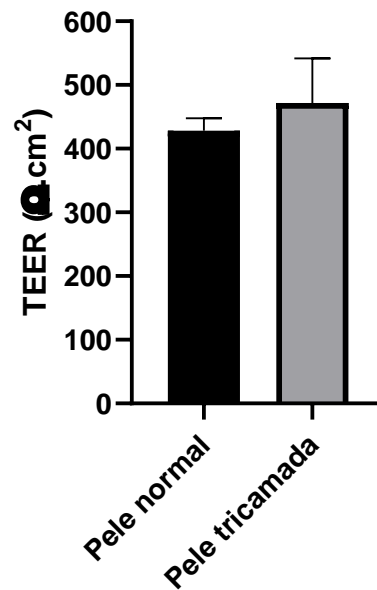


Legenda: *** $p < 0.0001$, ANOVA dois critérios *post-hoc* análise de múltiplas comparações de Bonferroni.

Como método quantitativo para verificar a função barreira em modelos equivalentes de pele, além da aplicação de detergentes, também pode ser avaliada a resistividade elétrica de uma corrente que passa da epiderme sentido a hipoderme.

Ambos os modelos de pele tricamada e pele normal apresentaram valores próximos de resistividade elétrica, sendo que o modelo de pele tricamada apresentou média de $471,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ enquanto a pele normal $428,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Pela Figura 18, não há diferença significativa entre o modelo de pele normal e pele tricamada, porém a pele tricamada apresenta tendência a maior resistividade, apesar de também apresentar maior variabilidade em relação à média.

Figura 18. Resistividade elétrica transepitelial (TEER) dos modelos de pele normal e pele tricamada (média e desvio padrão).



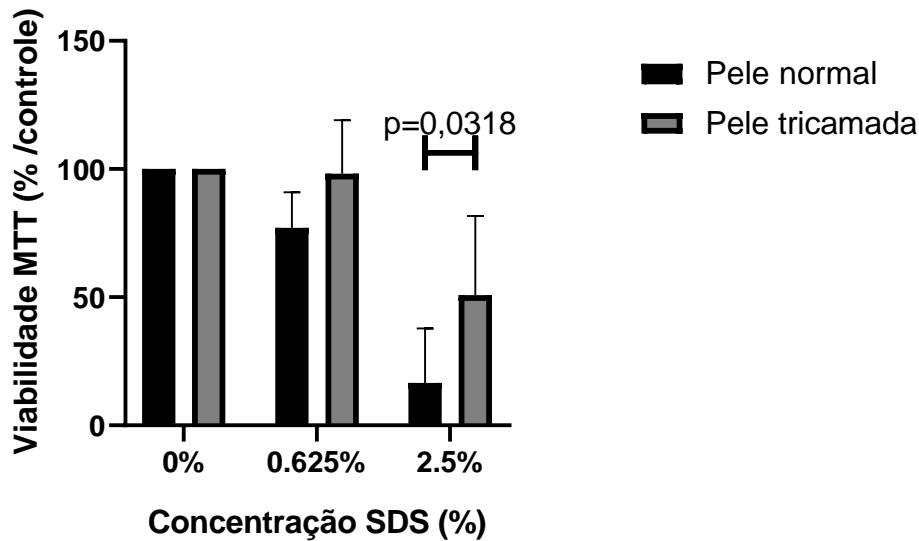
4.3.3. Teste de irritação aguda com SDS

Este teste tem a intenção de investigar se a camada hipodérmica estaria relacionada com a maior capacidade de recuperação de lesões, pela presença de adiponectina, e assim por esta exercer atividade antiinflamatória, se esta poderia exercer um efeito de redução da síntese de interleucinas inflamatórias após lesão química induzida.

O gráfico da Figura 19 mostra o efeito da concentração de SDS (dodecil sulfato de sódio) na viabilidade das células da pele, medida pelo método MTT. O SDS é um surfactante aniônico classificado como irritante para pele. A Figura 19 mostra que a viabilidade das células da pele diminui com o aumento da concentração de SDS, tanto para a pele normal quanto para a tricamada. No entanto, a pele tricamada parece ser mais resistente ao SDS do que a pele normal, pois apresenta maior viabilidade nas concentrações testadas após a recuperação de 42 h da exposição ao SDS.

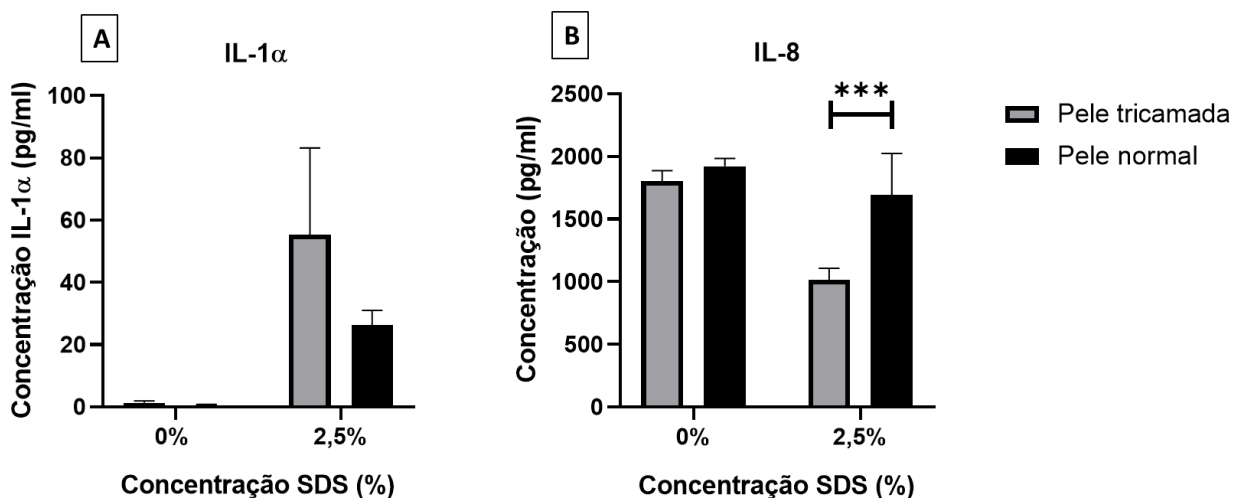
Corroborando com os resultados apresentados, por uma possível maior função barreira da pele tricamada e/ou por uma maior recuperação desta após a irritação aguda, mostraram que a pele tricamada apresenta menor dano tecidual quanto maior a irritação provocada, com diferença significativa quando aplicado SDS a 2,5%.

Figura 19. Avaliação viabilidade celular por MTT dos modelos de pele humana reconstruída normal e tricamada após aplicação de SDS nas concentrações descritas para indução da irritação aguda por 15 min.



A lesão irritativa na epiderme, que ativa o mecanismo de reparação, foi avaliada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante do meio de cultura das peles após 42 horas da aplicação do SDS entre os dois tipos de pele reconstruída *in vitro*.

Figura 20. Concentração de IL-1 α e IL-8 secretados a partir do sobrenadante da cultura após 42h horas da exposição aguda ao SDS nas concentrações 0 e 2,5%.



Legenda: ***p=0,0008, ANOVA dois critérios *post-hoc* análise de múltiplas comparações de Bonferroni.

Através dos gráficos, a concentração de IL-1 α é maior na pele tricamada em comparação com a pele normal, o que poderia indicar uma maior ativação das vias inflamatórias e de reparação. Por outro lado, foi evidente a menor secreção de IL-8 na concentração de maior queda na viabilidade dos modelos de pele, com o SDS a 2,5%.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, modelos equivalentes de pele humana são amplamente utilizados e validados para verificar a segurança e eficácia de produtos nas indústrias química, farmacêutica e de cosméticos. No entanto, estes ainda podem se aprimorar na sua tanto na organização morfológica, quanto em relação à incorporação de outros tipos celulares, como os adipócitos, para ampliar a representatividade da pele humana *in vivo* (Min et al., 2018; Yan et al., 2018).

Deste modo, a reconstrução de um modelo de pele tridimensional, incluindo os componentes dérmicos, epidérmicos e que incluam uma representação da hipoderme, fornecem uma plataforma mais fidedigna para os estudos da biologia da pele e metabolismo, de suas aplicações terapêuticas para o reparo de feridas e para o desenvolvimento científico e tecnológico de métodos alternativos ao uso de animais para os testes de segurança e eficácia de produtos cosméticos e medicamentos tópicos [Click or tap here to enter text.](#)

Para reconstruir a camada hipodérmica *in vitro*, os adipócitos são as células componentes mais representativas do tecido original. Assim, o objetivo deste estudo foi aumentar a complexidade de um modelo de pele humana reconstruído *in vitro* contendo uma representação funcional da camada hipodérmica para avaliar qual a influência deste tecido para a homeostase da epiderme humana em um modelo de pele tricamada.

A literatura sobre adipócitos em monocamada é sólida. Porém, a literatura é escassa de modelos tricamada que representem as funções das três camadas adequadamente para responder à essa questão. Especificamente, a adição dos adipócitos funcionais em esferoides e diferenciados a partir de seus progenitores células mesenquimais multipotentes, constituindo um modelo de hipoderme em modelos de pele tricamada é escasso.

Para se reconstruir o modelo tricamada, a obtenção de adipócitos maduros *in vitro* foi o desafio inicial. Alguns estudos usaram adipócitos maduros cultivados *ex vivo*, porém

estes são passíveis de sofrer estresse oxidativo e não responderem adequadamente a estímulos *in vitro* (Nicu et al., 2018). Sendo assim, as células mesenquimais multipotentes são uma alternativa plausível para a diferenciação *in vitro*, já que este processo ainda tem a capacidade de preservar as características de seu tecido de origem (Palumbo et al., 2018).

Assim, a partir de protocolos estudados a partir dos trabalhos de Lee e colaboradores (2012), Gojanovich e colaboradores (2018) e Zhu e colaboradores (2013), o protocolo para a extração das células mesenquimais multipotentes primárias foi estabelecido, independentemente do tipo de amostra cirúrgica obtida de tecido adiposo, entre lipoaspiração e o tecido adiposo. Assim que obtidas e congeladas as células derivadas de seis pacientes diferentes, estas foram ainda caracterizadas como células mesenquimais multipotentes por citometria de fluxo (Gojanovich et al., 2017).

Anteriormente à obtenção das células mesenquimais multipotentes, obtivemos as células murinas 3T3-L1 para estudar os métodos de indução adipogênica. Assim, foram testados distintos métodos que se diferenciam nas concentrações de suplementos adicionados nas células pré-adipócitos murinas, 3T3-L1, entre eles: isobutilmetilxantina, dexametasona, rosiglitazona e insulina.

Este resultado foi importante para a definição do meio de diferenciação a ser usado posteriormente nas células de origem humana. Mesmo assim, é importante apontar uma diferença controversa na literatura entre as células humanas e murinas: a presença de soro durante a indução adipogênica. Alguns autores defendem que a presença de soro reduz a capacidade de diferenciação dos adipócitos humanos, mesmo em baixas quantidades (Lee et al., 2012). Para células murinas pré-adipócitos, 3T3-L1, resultados conflitantes foram publicados, alguns autores apontam que estas não sobrevivem sem a presença de soro (Kuri-Harcuch et al., 1978), enquanto outros relatam a melhoria da diferenciação sem a presença de soro (Hauner et al., 1990; Schmidt et al., 1990). Neste experimento, não foi utilizado soro para a indução adipogênica das células 3T3-L1. E este não se mostrou necessário para atingir o acúmulo lipídico aparente dos adipócitos, em contradição do que foi utilizado por alguns autores (Zebisch et al. 2012; Turner et al., 2015; Zoico et al., 2018). Além disso, de acordo com Lee e colaboradores (2012), diferentemente das células murinas, as humanas necessitam do uso de tiazolidinedionas para a maturação das células mesenquimais multipotentes em adipócitos.

Os resultados indicam que a partir das células progenitoras, os adipócitos atingiram sua diferenciação e maturação, pelo evidente acúmulo lipídico, característico de adipócitos maduros, pela coloração vermelha apolar do corante *Oil-Red*. Então, o meio de diferenciação foi selecionado para ser usado nas células mesenquimais multipotentes primárias humanas, de forma tempo-dependente para induzir a maturação à adipócitos (Lee et al., 2012).

As culturas de adipócitos tridimensionais usando esferóides permitem a diferenciação adipogênica mais efetiva, com acúmulo lipídico e a secreção de adipocinas, como a adiponectina, de forma mais relevante para o estudo de sua biologia (Klingelhutz et al., 2018).

Os esferóides de adipócitos formados foram diferenciados com sucesso *in vitro*, seguindo o meio de diferenciação determinado anteriormente usando as células 3T3-L1. Os esferóides de adipócitos apresentaram, pela avaliação histológica, espaços intercelulares não preenchidos, que são representativos de acúmulo lipídico, indicando a maturação destes. Este processo ocorre durante a inclusão em parafina das amostras, que ao serem desidratadas com solventes, como o xilol, ocorre a diluição dos lipídeos acumulados e a imagem remete a vácuos circulares característicos do tecido adiposo. Além disso, a presença de adiponectina nos esferóides de adipócitos feitos por imunohistoquímica também demonstrou sua diferenciação, já que apenas adipócitos maduros secretam adiponectina, entre outras adipocinas.

Dois protocolos distintos entre a determinação do protocolo e no momento efetivo de início dos experimentos foram usados para se obter os esferóides de adipócitos diferenciados a partir das células mesenquimais tronco. Estes se distinguiram entre o método *hanging drop* e a utilização de micromolde com agarose. No momento dos experimentos comparativos entre as peles normal e tricamada, foi utilizado menor número de células e maior tempo em cultura ao seguir o método do micromolde, baseado no protocolo descrito por Ioannidou e colaboradores (2021). Neste, os esferóides tiveram seu crescimento e maturação, pela síntese de adiponectina, acompanhado e demonstraram o mesmo sucesso na obtenção dos esferóides ao qual foi obtido usando o método *hanging-drop*. Porém, utilizando os micromoldes de agarose, a manipulação e cultivo dos esferóides foi mais fácil e prática.

O início da secreção de adiponectina a partir do 4º dia da adição do meio de diferenciação dos adipócitos está de acordo com o observado por Lee et al. (2012), que

também descreveu a proporcionalidade entre tempo de indução adipogênica e maturação dos adipócitos. Em concordância, nos estudos de Ioannidou e colaboradores (2021) e de Kligelhuntz (2017) estes acompanharam o crescimento dos esferóides de adipócitos por mais de 30 dias e demonstraram que o acúmulo de lipídeos e secreção de adipocinas é proporcional ao tempo de cultura e indução adipogênica, assim estes atingem a maior expressão de marcadores de adipogênese após o 14º dia de cultivo dos esferóides de adipócitos. Em concordância com esses resultados, para a inclusão dos adipócitos obtidos a serem incluídos no modelo de pele tricamada, a secreção de adiponectina foi acompanhada, e atingiu seu pico de secreção no 16º dia, sendo então incluída na pele tricamada no 18º dia.

Além de se encontrarem em um formato mais representativo ao *in vivo*, os esferóides já diferenciados que foram coletados e adicionados à matriz de colágeno apresentaram contínuo crescimento e podemos ver o acúmulo lipídico atingido na sua maturação nas histologias apresentadas, principalmente no protocolo I. Neste protocolo, também não há invasão de queratinócitos, como ocorreu na tentativa de separar o colágeno em duas distintas camadas, seguindo o protocolo II. Este fenômeno provavelmente ocorreu, pois, populações diferentes de células em formatos 3D e em 2D de foram adicionadas a duas camadas distintas de colágeno. E, se observou uma contração muito maior do colágeno quando adicionado células em 2D em comparação com esferóides, permitindo a formação de camadas com contrações distintas, o que possibilitou a provável invasão de queratinócitos entre elas, como observado no Protocolo II.

Portanto, o Protocolo I foi estabelecido para reproduzir a pele tricamada e para a reprodução da pele *in vitro* em uma cultura 3D de forma a reproduzir o *in vivo* de forma mais fidedigna. Dessa forma, esse modelo pode ser aplicado como plataforma para diferentes estudos que abrangem as interações da pele com o metabolismo. Para atingir tal objetivo, avaliar a síntese de adiponectina entre os modelos de pele foi imprescindível para permitir algumas associações sobre os resultados observados.

Como a secreção de adiponectina é muito importante para a manutenção da camada epidérmica, os queratinócitos apresentam receptores para a adiponectina (SHIBATA et al., 2012). Podemos ver na imunohistoquímica apresentada para comparação entre os protocolos para a definição do melhor método de pele tricamada, que a adiponectina está marcada também na camada epidérmica, indicando a relação entre a secreção de

adiponectina pelos esferóides adiposos e sua captação pelos queratinócitos. Pela localização dos receptores de adiponectina em queratinócitos, principalmente localizados na camada basal da epiderme, é reconhecido que existe uma relação direta de parácrina local entre tecido adiposo hipodérmico e a epiderme, assim como esta mesma relação de forma endócrina (Dadson, Liu, Sweeney, 2011). Assim, é reconhecido que a adiponectina exerce distintos efeitos sobre os queratinócitos, mas não há evidência que os queratinócitos produzam adiponectina, o que é explícito por seus receptores AdipoR1 serem extracelulares. Assim, a marcação do anticorpo anti-adiponectina obtida na camada epidérmica nos modelos de pele contendo os adipócitos poderia ser resultado do transporte de adiponectina da camada hipodérmica para a epiderme. Porém o exato motivo da marcação permanece indefinido.

A adiponectina é uma citocina que é primariamente secretada por adipócitos e possui atividades anti-inflamatórias (Magge et al., 2011). Para a pele humana, a adiponectina é bem caracterizada em seus efeitos de modular a proliferação e diferenciação de queratinócitos (Takahashi et al., 2010; Kawai et al., 2010; Jin et al., 2017), regular o processo de cicatrização (Salathia et al., 2013; Shibata et al., 2012), moderar a inflamação (Shibata et al., 2015; Seo et al., 2019) e a senescência celular (Akazawa et al., 2011; Kim et al., 2016). Além disso, a adiponectina estimula a função barreira pelo aumento da síntese lipídica nos queratinócitos (Hong et al., 2019) e com a regulação da expressão de filagrina na epiderme (Choi et al., 2018; Jin; Park; Seo, 2017).

A partir desta importância fundamental para a homeostase da epiderme, a coleta dos sobrenadantes no dia final de maturação entre os modelos de pele tricamada e pele normal para a quantificação de adiponectina, permitiu a diferenciação entre estes modelos, uma vez que foi observado que sem a presença da camada hipodérmica, não há a secreção de adiponectina. Assim, algumas inferências a serem feitas em sequência, de acordo com os resultados dos experimentos, podem ser associadas com a secreção da adiponectina.

Os atuais modelos de pele tridimensional reconstruída apresentam a função barreira mais permeável e com maior perda de água em comparação com a pele humana (Garcia et al., 2002). Portanto, pela presença de adiponectina diferencialmente secretada no modelo de pele tricamada, representando a camada hipodérmica, poderia esta, além de aumentar a função barreira da epiderme, auxiliar na maior recuperação de lesões, e por

ser anti-inflamatória, também exercer um efeito de redução da síntese de interleucinas inflamatórias após lesão induzida?

Para responder tal pergunta, inicialmente foram verificadas a expressão de proteínas importantes que constituem a formação da camada epidérmica, como as estruturais que marcam a estratificação epidérmica e de diferenciação terminal do estrato córneo, responsável pela função barreira da epiderme. Apesar de não apresentar diferença entre as citoqueratinas, há maior expressão de loricrina e involucrina, sendo que a expressão de involucrina tem diferença significativa ($p=0,0485$). Esses resultados podem ser correlacionados com os observados por Seo e colaboradores (2019), que demonstram aumento da expressão de loricrina em seu modelo de epiderme humana reconstruída com características de dermatite atópica pela presença de adiponectina (Seo et al., 2019).

Além disso, a maior expressão de PPAR- γ obtida nos resultados, tem uma relação de feedback positivo com a adiponectina. O PPAR- γ é o fator de transcrição central da biologia dos adipócitos, por controlar os processos de homeostase lipídica e de glicogênese, e inclusive, a secreção de adipocinas pelos adipócitos, como a adiponectina. Por outro lado, a adiponectina, ao se ligar em seus receptores AdipoR1, presente em queratinócitos, também pode ativar a sinalização via PPAR- γ , levando a modulação da expressão de genes ligados ao metabolismo energético e inflamação (Astapova & Leff, 2012). Assim, a maior expressão de PPAR- γ encontrada nos resultados da pele tricamada estão condizentes com a maior secreção de adiponectina da pele tricamada, como ilustrado na Figura 16.

Como os PPARs possuem um papel importante na sinalização *downstream* da adiponectina, estes também são associados aos efeitos benéficos promovidos pela adiponectina na pele, como promover a diferenciação dos queratinócitos, aumentar a síntese lipídica, acelerar a regeneração da barreira epidérmica e moderar a inflamação (Schmuth et al., 2014).

Dai e colaboradores (2007) mostraram que existe uma relação direta entre a maior ativação de PPAR- γ com o aumento da expressão de involucrina em queratinócitos em monocamada. Esse resultado se correlaciona com os observados no nosso, em que temos maior expressão de involucrina nas peles tricamada, e assim, esse aumento também pode ser relacionado com a maior presença de adiponectina.

Portanto, tanto pela secreção de adiponectina, expressão aumentada de involucrina e loricrina, quanto pela maior expressão do PPAR- γ nos modelos de pele tricamada, os experimentos de função barreira e de irritação aguda, foram desenhados

para se verificar como o modelo de pele tricamada responderia, com maior função barreira, recuperação após lesão e modulação das citocinas pró-inflamatórias.

Para se determinar a função barreira de um equivalente de pele é necessário unir testes complementares, como a medida da resistividade elétrica e permeação de detergentes, entre outros (Boogard et al., 2021).

A resistividade elétrica transepitelial (TEER) mede a integridade e a função barreira de tecidos epiteliais, como a pele, e modelos de pele (de Araújo et al., 2021). A epiderme, é a principal camada a fornecer alta resistência a passagem elétrica, principalmente na camada córnea, cuja composição abrange uma camada de células anucleadas extremamente empacotadas, interligadas por junções intercelulares, e intracelulares por ligações cruzadas com proteínas e lipídeos hidrofóbicos. Assim, quanto maior a resistividade elétrica sofrida por uma corrente elétrica que passa pela pele, maior a função barreira apresentada por esta.

Apesar de ser complexa a comparação do TEER entre equivalentes de pele, pois estes dependem muito das condições experimentais e do inserto ao qual está incluído o modelo. Os valores obtidos estão inclusos de acordo com os apresentados no modelo equivalente comercial e validado para critérios regulatórios como plataforma para testes de segurança em cosméticos, SkinEthic® ($500 \pm 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (Kandarova et al., 2006).

A capacidade de resistência da pele a detergentes é um dos indicadores mais confiáveis da sua integridade em termos de função de barreira (Angelova-Fischer, 2016). Essa integridade é crucial para determinar o quão eficaz a pele é em impedir a penetração de substâncias irritantes. Portanto, testes de função de barreira que utilizam detergentes irritantes, como SDS ou Triton-X, são recomendados em diretrizes internacionais, conforme descrito no Guia 439 de Irritação *in vitro* (OECD, 2021).

Assim, para se complementar a caracterização dos modelos de pele enquanto a função barreira foi aplicado SDS em concentrações de 0 a 5 mg/ml por 18 horas. Dentro dessa faixa de concentração aplicada é esperado que se determine a concentração ao qual a viabilidade seja reduzida a 50% (IC50). Quanto maior o valor de IC50, mais resistente é considerado a função barreira deste modelo de pele reconstruída. Infelizmente, não foi possível atingir o objetivo de determinar o IC50, pois as concentrações de SDS seguindo as usadas tradicionalmente no teste em modelos de epiderme humana, não foram o suficiente para reduzir a viabilidade celular nos modelos de pele mais complexos como o da pele normal e da pele tricamada, pois estas apresentam maior função barreira, assim como descrito por Catarino e colaboradores (2018).

Ainda assim, foi possível verificar um aumento significativo na viabilidade celular dos modelos de pele tricamada em relação a pele normal na maior concentração de SDS (5 mg/ml), induzindo a um aumento da viabilidade celular da pele tricamada em aproximadamente 50%. Estes resultados podem indicar que, como apontado na literatura, a presença de células adiposas pode estimular a proliferação e diferenciação de células epidérmicas (Moon et al., 2012; Aoki et al., 2004; Lee et al., 2012; Schmidt & Horsley, 2013), principalmente após um estímulo irritativo, que incitaria os mecanismos de reparação tecidual.

A função dos adipócitos na promoção da recuperação de ferimentos já é muito bem estabelecida pela literatura. Estes são responsáveis por secretar fatores de crescimento e adipocinas, que mobilizam e direcionam a migração e proliferação de fibroblastos e miofibroblastos para a deposição da matriz extracelular (Schmidt e Horsley, 2013; Marangoni e Lu, 2017), atividade imune (Zhang et al., 2015) e a angiogênese (El-Hattab et al., 2020). Exatamente por isso, as células adiposas estão sendo extensamente utilizadas na clínica para promover a reconstrução tecidual e cicatrização de lesões traumáticas (Klinger et al., 2013), queimaduras (Sultan et al., 2012; Piccolo et al., 2020) e até mesmo radiação (Sultan et al., 2011; Borrelli et al., 2019). Portanto, é evidente que as adipocinas, fatores de crescimento e células derivadas dos adipócitos promovem um papel relevante na recuperação de lesões.

Apesar de este potencial dos adipócitos já ter sido explorado em alguns estudos com modelos tricamada para o fechamento de feridas (Kim et al., 2018; Halder et al. 2019), são escassos os estudos de sua recuperação pós-lesão induzida por substâncias caracterizadas como irritantes.

Schmidt e colaboradores (2013) reconstruíram um modelo de pele contendo adipócitos para o teste de substâncias irritantes, e encontrou nos resultados maior função barreira da epiderme, incluindo maior resistência a detergentes aplicados, em comparação com outro modelo tridimensional, condizente com os resultados apresentados nesta tese. Porém neste estudo foram usados adipócitos maduros e cultivados *ex vivo* para reconstruir o modelo, o que não é ideal devido ao metabolismo destes, como descrito anteriormente, ser em sua fase final de maturação, que tem capacidade limitada de adaptação, e com isso pode sofrer estresse oxidativo em condições *in vitro* (Nicu et al., 2018). Além disso, os modelos usados para a comparação do tricamada, no qual foi usado o modelo de pele bicamada como controle, não funcionaram para classificar substâncias irritantes, seguindo a OECD 439, e ainda assim o autor promove que seu constructo tricamada seria

superior aos modelos de pele bicamada (Schmidt et al., 2013). Porém, como publicado por nosso grupo, é esperado para a validação dos modelos de pele reconstruída, incluindo modelos mais simples, como o epidérmico, que estes tenham a capacidade de distinguir as substâncias descritas no guia (Bagatin et al., 2023; Pedrosa et al., 2017). No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os de Schmidt (2013) em relação a maior viabilidade celular da pele tricamada após a aplicação de substâncias irritantes. Desta forma, a pele tricamada apresentou menor dano tecidual à medida que se aumentou a concentração de SDS, com diferença significativa quando aplicado a 2,5%.

O SDS quando aplicado ao estrato córneo, pode romper a barreira cutânea e penetrar na epiderme. Com isso, as estruturas proteicas se alteram ocorrendo uma hidratação indesejada e ocorre a desorganização das bicamadas lipídicas (Ghosh e Blankschein, 2007). Além disso, com o dano celular promovido, os queratinócitos desempenham um importante papel na inflamação local pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. Substâncias irritantes geram o aumento da expressão de IL-1 α inicialmente, ao qual subsequentemente ativa outras citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-8. A intensidade da inflamação produzida é proporcional a produção de citocinas inflamatórias (Le et al., 1996; Lee et al., 2013; Jina et al., 2014).

Em resposta à inflamação, mecanismos de reparação tecidual se iniciam, incluindo a indução da proliferação dos queratinócitos na camada basal e estímulo a diferenciação epidérmica (Fuchs e Raghavan, 2002). Isso pode ser observado nos resultados após irritação por SDS no teste de função barreira, que após estímulo irritativo a uma concentração baixa de 5 mg/ml SDS por 18 horas, a pele respondeu com um aumento de 50% na viabilidade celular.

A quantidade de interleucina 1 alfa (IL-1 α) produzida e liberada por queratinócitos da epiderme está diretamente relacionada à exposição a produtos químicos irritantes, e, portanto, pode ser empregada como um indicador preditivo de irritação química (Kidd et al., 2007). Apesar de não apresentar diferença significativa, podemos ver uma tendência de maior secreção de IL-1 α pela pele tricamada após lesão química induzida por SDS a 2,5%. Por outro lado, esta foi a que apresentou significativa recuperação da viabilidade celular após as 42h de recuperação em comparação com a pele bicamada. Como a IL-1 α é o principal fator para regeneração tecidual pós lesões, ou seja, é responsável por estimular a proliferação e mobilização de células para a re-epitelização e reconstrução da matriz dérmica (Diep et al., 2022), a maior secreção de IL-1 α observada nas peles tricamada podem ter induzido um mecanismo de reparação tecidual proporcional à sua

maior concentração, que levou à maior recuperação pós-lesão química em comparação à pele bicamada, evidenciado por maior viabilidade celular após 42h da exposição de 2,5% de SDS.

Outra hipótese para justificar a menor secreção de IL-1 α pela pele normal em comparação com a pele tricamada pode ser consequência da pronunciada diferença de morte celular ocorrida na pele normal, pois como observado nos estudos de Bagatin e colaboradores (2023), a morte celular é proporcional à secreção reduzida de IL-1 α .

Em células endoteliais, a adiponectina promove um efeito de redução da síntese de IL-8 após estímulo inflamatório, reduzindo o potencial de causar doenças como aterogênese (Kobayashi et al., 2005). Além disso, um modelo de epiderme reconstruída teve redução da IL-8 após tratamento com adiponectina, o que demonstra o efeito anti-inflamatório desta citocina (Seo et al., 2019). Estes resultados se relacionam com a menor secreção de IL-8 da pele tricamada, que contém maior concentração de adiponectina liberada em seu sobrenadante, como demonstrado nos imunoenaios.

A ativação de PPAR- γ também está envolvida com a regulação da expressão de genes pelo antagonismo direto de fatores de transcrição dependentes de ligantes, como os membros das famílias NF- κ B e AP-1 (Leying et al, 2022). A ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) é central para a secreção de IL-8 (Sakamoto et al., 2003). Por isso, a estimulação da ativação da expressão de PPAR- γ foi comprovada em modelos murinos para melhorar sintomas inflamatórios de pele relacionados com disfunção da barreira epidérmica, como dermatite atópica e psoríase (Ramot et al., 2015). Além disso, em células estromais endometriais, a inflamação induzida por TNF- α , que ativa a secreção de IL-8, ao ser tratada com agonista de PPAR- γ , reduziu substancialmente a produção de IL-8 (Ohama et al., 2008). Esses estudos podem se correlacionar com os resultados observados de menor secreção de IL-8 após inflamação induzida por irritação química na pele tricamada, que também apresenta maior expressão de PPAR- γ em comparação com a pele bicamada.

De acordo com Kligelhutz (2018), é muito rara a criação de miméticos de tecido adiposo contendo adipócitos funcionais, ou seja, que apresentam secreção de adiponectina e acúmulo de lipídeos uniloculares como no tecido adiposo nativo, sendo que a maioria dos autores prefere trabalhar diretamente com adipócitos maduros, mesmo com suas desvantagens metabólicas *in vitro*. Porém, a pele tricamada aqui demonstrada possui todas as características descritas para termos obtido o sucesso na formação de um tecido representativo adiposo, e ainda podemos verificar que o esferóide já diferenciado,

mesmo incluído em matriz de colágeno e colocado em um meio que não continha os indutores de adipogênese, manteve as características de secreção de adiponectina, além de apresentar a presença de grande acúmulo de lipídeos uniloculares.

Portanto, este modelo de pele tricamada pode ser muito útil para o teste de eficácia e segurança de medicamentos e cosméticos, assim como para o estudo das interações de doenças metabólicas relacionadas ao tecido adiposo, como diabetes e obesidade, e estudar a relação da camada hipodérmica com a pele em relação à câncer, envelhecimento e fechamento de feridas, como muitas evidências na literatura apontam.

Por fim, coletivamente este capítulo aborda uma ferramenta *in vitro* promissora e funcional para os estudos sobre metabolismo, adipocinas e sua relação com a pele humana.

6. CONCLUSÃO

O protocolo para a confecção de um modelo de pele tricamada contendo a representatividade da hipoderme foi estabelecido com sucesso, uma vez que os esferóides de adipócitos foram diferenciados *in vitro* para representar esta camada fundamental para a pele humana. A camada hipodérmica se demonstrou completamente funcional pela secreção de adiponectina, acúmulo lipídico unilocular e presença diferenciada de PPAR- γ , o fator de transcrição central do metabolismo dos adipócitos. Pela presença diferenciada de adiponectina e sua correlação positiva com o PPAR- γ , a pele tricamada apresentou maior expressão proteica de marcadores terminais fundamentais para a diferenciação córnea. Assim, foi testada a hipótese criada com base na literatura que a pele tricamada poderia apresentar maior função barreira em relação a pele bicamada, utilizando os testes de função barreira. Porém, estes não foram suficientes para se concluir essa hipótese, apesar de a pele tricamada demonstrar no teste com SDS por 18h e na medida de resistividade elétrica que houve indícios de maiores vantagens para o modelo que contém os adipócitos. Por fim, a pele tricamada apresentou maior recuperação da viabilidade tecidual após irritação aguda com SDS a 2,5%. Este resultado foi provavelmente induzido por maior secreção de IL-1 α , que ativam os mecanismos de reparação tecidual. Por outro lado, a presença dos adipócitos também levou a uma modulação anti-inflamatória de IL-8, que pode estar relacionada com a maior presença da adipocina anti-inflamatória adiponectina e seu feedback positivo com PPAR- γ .

Portanto, o modelo de pele tricamada se demonstrou funcional e com vantagens em relação ao equivalente de pele representado pela bicamada, o que demonstra a relevância de se aprimorar os modelos de forma mais representativa à pele humana para estudos sobre a sua biologia e testes de segurança e eficácia de produtos tópicos e cosméticos.

7. REFERÊNCIAS

ABCAM. Abcam, 2012. Question (52349) Anti-Adiponectin antibody [19F1] (ab22554). Disponível em: [\[https://www.abcam.com/adiponectin-antibody-19f1-ab22554/questions/52349\]](https://www.abcam.com/adiponectin-antibody-19f1-ab22554/questions/52349). Acesso em: 30 ago 2023.

AKAZAWA, Yumiko et al. Adiponectin resides in mouse skin and upregulates hyaluronan synthesis in dermal fibroblasts. **Connective tissue research**, v. 52, n. 4, p. 322-328, 2011.

AOKI, Shigehisa et al. Bone marrow stromal cells, preadipocytes, and dermal fibroblasts promote epidermal regeneration in their distinctive fashions. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 10, p. 4647-4657, 2004.

ASTAPOVA, Olga; LEFF, Todd. Adiponectin and PPAR γ : cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. **Vitamins & Hormones**, v. 90, p. 143-162, 2012.

BORRELLI, Mimi R. et al. Fat grafting rescues radiation-induced joint contracture. **Stem cells**, v. 38, n. 3, p. 382-389, 2020.

BROHEM, Carla A. et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 1, p. 35-50, 2011.

CAMARENA, Denisse Esther Mallaupoma et al. Development of epidermal equivalent from electrospun synthetic polymers for in vitro irritation/corrosion testing. **Nanomaterials**, v. 10, n. 12, p. 2528, 2020.

CATARINO, Carolina Motter et al. Skin corrosion test: A comparison between reconstructed human epidermis and full thickness skin models. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, p. 51-57, 2018.

CHEN, Stella X.; ZHANG, Ling-Juan; GALLO, Richard L. Dermal white adipose tissue: a newly recognized layer of skin innate defense. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 5, p. 1002-1009, 2019.

CHOI, Sun Young et al. The effect of adiponectin on the regulation of filaggrin expression in normal human epidermal keratinocytes. **Annals of dermatology**, v. 30, n. 6, p. 645-652, 2018.

CIDONIO, Gianluca et al. The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 209, p. 10-24, 2019.

CONCEA. (2014). RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014. Diário Oficial Da Uniao, 9.

CONCEA. (2016). RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016. Diário Oficial Da Uniao, 4.

COTOVIO, José et al. The in vitro acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 4, p. 329-349, 2005.

CREPALDI, Maria Clara de Araújo et al. Toxicity evaluation of antiglycation compounds in glycated artificial skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 48 res. FCF092, 2013.

DAI, Xiuju et al. STAT5a/PPAR γ pathway regulates involucrin expression in keratinocyte differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 7, p. 1728-1735, 2007.

DATTA, Néha et al. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2488-2493, 2006.

DE ARAÚJO, Jaiza Samara Macena et al. Resistivity technique for the evaluation of the integrity of buccal and esophageal epithelium mucosa for in vitro permeation studies: Swine buccal and esophageal mucosa barrier models. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 643, 2021.

DE OLIVEIRA, Érica Aparecida; GODING, Colin R.; MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi. Tumor Models and Cancer Systems Biology for the Investigation of Anticancer Drugs and Resistance Development. **Organotypic Models in Drug Development**, p. 269-301, 2021.

DIEP, Sydney et al. Interleukin-1 and Nuclear Factor Kappa B signaling promote breast cancer progression and treatment resistance. **Cells**, v. 11, n. 10, p. 1673, 2022.

DO NASCIMENTO PEDROSA, Tatiana et al. Skin equivalent models: Protocols for in vitro reconstruction for dermal toxicity evaluation. **Toxicity Assessment: Methods and Protocols**, p. 31-41, 2021.

DO NASCIMENTO PEDROSA, Tatiana et al. Methyl- β -cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model. *Archives of dermatological research*, v. 309, p. 63-69, 2017.

DO NASCIMENTO PEDROSA, Tatiana et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 31-37, 2017.

DOKOSHI, Tatsuya et al. Hyaluronidase inhibits reactive adipogenesis and inflammation of colon and skin. **JCI insight**, v. 3, n. 21, 2018.

DONATI, Giacomo et al. Epidermal Wnt/ β -catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 15, p. E1501-E1509, 2014.

EZURE, Tomonobu; AMANO, Satoshi. Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts. **Biofactors**, v. 31, n. 3-4, p. 229-236, 2007.

FALLER, C. et al. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. **Toxicology in vitro**, v. 16, n. 5, p. 557-572, 2002.

FELDMEYER, Laurence et al. Interleukin-1, inflammasomes and the skin. **European journal of cell biology**, v. 89, n. 9, p. 638-644, 2010.

FESTA, Eric et al. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 761-771, 2011.

GARCIA, N. et al. Characterization of the barrier function in a reconstituted human epidermis cultivated in chemically defined medium. **International journal of cosmetic science**, v. 24, n. 1, p. 25-34, 2002.

GASQUE, Kellen Cristina da Silva et al. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 381-385, 2014.

GHOSH, S.; BLANKSCHEIN, D. The role of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles in inducing skin barrier perturbation in the presence of glycerol. **Journal of Cosmetic Science**, v. 58, n. 2, p. 109- 133, 2007.

GUERRERO-JUAREZ, Christian F.; PLIKUS, Maksim V. Emerging nonmetabolic functions of skin fat. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 163-173, 2018.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 6, p. 858-880, 2004.

HARTUNG, Thomas. Toxicology for the twenty-first century. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 208-212, 2009.

HIEDA, Daniele Seo et al. Air particulate matter induces skin barrier dysfunction and water transport alteration on a reconstructed human epidermis model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 12, p. 2343-2352. e3, 2020.

HÖFER, Thomas et al. Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. **Archives of toxicology**, v. 78, p. 549-564, 2004.

HONG, Seung-Phil et al. Adiponectin enhances human keratinocyte lipid synthesis via SIRT1 and nuclear hormone receptor signaling. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 3, p. 573-582, 2019.

HU, Yu et al. Metabolic syndrome and skin diseases. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 788, 2019.

JIN, Sun Hee et al. Keratinocyte-derived IL-24 plays a role in the positive feedback regulation of epidermal inflammation in response to environmental and endogenous toxic stressors. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 280, n. 2, p. 199-206, 2014.

JIN, Taewon; PARK, Kui Young; SEO, Seong Jun. Adiponectin upregulates filaggrin expression via SIRT1-mediated signaling in human normal keratinocytes. **Annals of Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 407-413, 2017.

KANDÁROVÁ, Helena et al. Assessment of the skin irritation potential of chemicals by using the SkinEthic reconstructed human epidermal model and the common skin irritation protocol evaluated in the ECVAM skin irritation validation study. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 34, n. 4, p. 393-406, 2006.

KAWAI, Kenichiro et al. Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes—implication of impaired wound healing in diabetes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 374, n. 2, p. 269-273, 2008.

KIM, MinJeong et al. Adiponectin suppresses UVB-induced premature senescence and hBD2 overexpression in human keratinocytes. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161247, 2016.

KLINGELHUTZ, Aloysius J. et al. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 523, 2018.

KLINGER, Marco et al. Autologous fat graft in scar treatment. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 24, n. 5, p. 1610-1615, 2013.

KOBASHI, Chikaaki et al. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. **Circulation Research**, v. 97, n. 12, p. 1245-1252, 2005.

KONG, Yi et al. New insights into different adipokines in linking the pathophysiology of obesity and psoriasis. **Lipids in health and disease**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2019.

KRUGLIKOV, Ilja L.; ZHANG, Zhuzhen; SCHERER, Philipp E. The role of immature and mature adipocytes in hair cycling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 2, p. 93-105, 2019.

KURI-HARCUCH, W. & GREEN, H. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1978; 75:6107–6109.

LANGHANS, Sigrid A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 6, 2018.

LE, Mai et al. Changes in keratinocyte differentiation following mild irritation by sodium dodecyl sulphate. **Archives of dermatological research**, v. 288, p. 684-690, 1996.

LEE, Haur Yueh et al. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

LEE, Seung Ho et al. Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. **Annals of Dermatology**, v. 24, n. 2, p. 136-143, 2012.

LEYING, Chen et al. Remodeling of inflamed adipose tissue in systemic lupus erythematosus is associated with enhanced generation of CD4+ T-cell-associated proinflammatory cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1260, 2022.

MAGGE, Sheila N. et al. Adiponectin is associated with favorable lipoprotein profile, independent of BMI and insulin resistance, in adolescents. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1549-1554, 2011.

MAK, Isabella WY; EVANIEW, Nathan; GHERT, Michelle. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. **American journal of translational research**, v. 6, n. 2, p. 114, 2014.

MAO-QIANG, Man et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)- γ activation stimulates keratinocyte differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 2, p. 305-312, 2004.

MARANGONI, Roberta Goncalves et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. **Arthritis & rheumatology**, v. 67, n. 4, p. 1062-1073, 2015.

MARIA-ENGLER, S. S. Harnessing skin reconstruction for testing topical agents in a healthy and diseased skin. **Toxicology Letters**, n. 259, p. S45, 2016.

MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi. Assessing the effects of advanced glycation end products in the skin. **British Journal of Dermatology**, v. 176, n. 1, p. 12-13, 2017.

MAZZOLENI, Giovanna; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, Nathalie. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?. **Genes & nutrition**, v. 4, n. 1, p. 13-22, 2009.

MIN, Daejin et al. Bioprinting of biomimetic skin containing melanocytes. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 5, p. 453-459, 2018.

MINI, Camila Alessandra et al. Immortalized equivalent human epidermis as a platform to evaluation hair dyes toxicity: efficiency comparison between 3D and monolayer culture. **Chemico-Biological Interactions**, v. 330, p. 109227, 2020.

MINI, Camila Alessandra et al. Immortalized keratinocytes cells generates an effective model of Epidermal Human Equivalent for irritation and corrosion tests. **Toxicology in Vitro**, v. 71, p. 105069, 2021.

MOON, Kyoung Mi et al. The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 1, p. 1239-1257, 2012.

NICU, Carina et al. A guide to studying human dermal adipocytes in situ. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 6, p. 589-602, 2018.

OHAMA, Yoko et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand reduced tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production and growth in endometriotic stromal cells. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 2, p. 311-317, 2008.

PECORARO, Antonio et al. Total and high molecular weight adiponectin expression is decreased in patients with common variable immunodeficiency: correlation with Ig replacement therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 895, 2017.

PEDROSA, Tatiana do Nascimento. **Desenvolvimento de epiderme humana reconstruída (RHE) como plataforma de testes in vitro para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunossupressão**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PENNACCHI, Paula Comune et al. Glycated reconstructed human skin as a platform to study the pathogenesis of skin aging. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 17-18, p. 2417-2425, 2015.

PICCOLO, Nelson Sarto et al. Fat grafting for treatment of facial burns and burn scars. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 47, n. 1, p. 119-130, 2020.

PLIKUS, Maksim V. et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. **Science**, v. 355, n. 6326, p. 748-752, 2017.

RAMOT, Yuval et al. The role of PPAR γ -mediated signalling in skin biology and pathology: new targets and opportunities for clinical dermatology. **Experimental dermatology**, v. 24, n. 4, p. 245-251, 2015.

RAVI, Maddaly et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.

SAKAMOTO, Yasuko et al. Tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor- κ B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 730-735, 2003.

SALATHIA, N. S.; SHI, J.; ZHANG, J.; GLYNNE, R. J. An in vivo screen of secreted proteins identifies adiponectin as a regulator of murine cutaneous wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 812-821, 2013. DOI:

SCHMIDT, Barbara A.; HORSLEY, Valerie. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. **Development**, v. 140, n. 7, p. 1517-1527, 2013.

Schmidt, Freia F.; NOWAKOWSKI, Sophia; KLUGER, Petra J. Improvement of a three-layered in vitro skin model for topical application of irritating substances. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 388, 2020.

SCHMUTH, Matthias et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- β/δ stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 4, p. 971-983, 2004.

SCHMUTH, Matthias et al. Role of PPAR, LXR, and PXR in epidermal homeostasis and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 3, p. 463-473, 2014.

SCHOLZ, Stefan et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 506-530, 2013.

SEO, Hee-Seok et al. Adiponectin attenuates the inflammation in atopic dermatitis-like reconstructed human epidermis. **Annals of Dermatology**, v. 31, n. 2, p. 186-195, 2019.

SEYHAN, Attila A. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide—identification of problems and overcoming obstacles. **Translational Medicine Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2019.

SHIBATA, Sayaka et al. Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 3231-3241, 2012.

SHIBATA, Sayaka et al. Adiponectin regulates psoriasiform skin inflammation by suppressing IL-17 production from $\gamma\delta$ -T cells. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 7687, 2015.

SHOOK, Brett A. et al. Dermal adipocyte lipolysis and myofibroblast conversion are required for efficient skin repair. **Cell Stem Cell**, v. 26, n. 6, p. 880-895. e6, 2020.

SINGH, Vijay K.; SEED, Thomas M. How necessary are animal models for modern drug discovery?. **Expert opinion on drug discovery**, v. 16, n. 12, p. 1391-1397, 2021.

SPIELMANN, Horst et al. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 35, n. 6, p. 559-601, 2007.

STUCHI MARIA-ENGLER, Silvy et al. Pele artificial como alternativa para experimentação em animais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, p. 118-125, 2010.

SULTAN, Steven M. et al. Fat grafting accelerates revascularisation and decreases fibrosis following thermal injury. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery**, v. 65, n. 2, p. 219-227, 2012.

SUN, Tao et al. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of biotechnology**, v. 122, n. 3, p. 372-381, 2006.

SYLVESTER, Paul W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Drug Design and Discovery: Methods and Protocols**, p. 157-168, 2011.

OHAMA, Yoko et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand reduced tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production and growth in endometriotic stromal cells. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 2, p. 311-317, 2008.

TAKAHASHI, H.; HONMA, M.; ISHIDA-YAMAMOTO, A.; IIZUKA, H. Adiponectin and leptin modulate cell proliferation and cytokine secretion of normal human keratinocytes and T lymphocytes. **Journal of Dermatological Science**, v. 59, n. 2, p. 143-145, 2010.

TIBBITT, Mark W.; ANSETH, Kristi S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 655-663, 2009.

VERMETTE, Mélanie et al. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 18, p. 2850-2860, 2007.

WAKI, Hironori et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: molecular structure and multimer formation of adiponectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 40352-40363, 2003.

WASKO, Renee R.; HORSLEY, Valerie. Thin skinned: aged adipocyte atrophy impacts innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 175-177, 2019.

WONG, Waihay J. et al. Hypoxia-inducible factors regulate filaggrin expression and epidermal barrier function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 454-461, 2015.

YAMANE, Takumi; KOBAYASHI-HATTORI, Kazuo; OISHI, Yuichi. Adiponectin promotes hyaluronan synthesis along with increases in hyaluronan synthase 2 transcripts through an AMP-activated protein kinase/peroxisome proliferator-activated receptor- α -dependent pathway in human dermal fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 2, p. 235-238, 2011.

ZANONI, Thalita B. et al. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). **Toxicology letters**, v. 227, n. 2, p. 139-149, 2014.

ZANONI, Thalita Boldrin et al. Allergens of permanent hair dyes induces epidermal damage, skin barrier loss and IL-1 α increase in epidermal in vitro model. **Food and chemical toxicology**, v. 112, p. 265-272, 2018.

ZHANG, Ling-juan et al. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. **Science**, v. 347, n. 6217, p. 67-71, 2015.

ZHAO, Xin et al. Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering. **Advanced healthcare materials**, v. 5, n. 1, p. 108-118, 2016.

CAPÍTULO III

Nocaut de expressão de IL13R α 2 em Epiderme Humana Reconstruída para estudar alteração de barreira

RESUMO

A dermatite atópica (DA) é uma doença eczematosa de pele caracterizada por inflamação do tipo Th2 com liberação de IL-4 e IL-13 e alteração da barreira epidérmica. Essas citocinas ativam os receptores IL-4R α /IL-13R α 1 tipo II em queratinócitos. E em sequência, o receptor IL-4R α /IL-2R γ tipo I pode ser induzido em queratinócitos em modelos de epiderme humana reconstruída (RHE). Um terceiro receptor, IL-13R α 2, considerado como receptor isca, ou seja, que não elicita diretamente vias de sinalização celular, também é ativado em queratinócitos em resposta às citocinas IL-4 e IL-13. Porém, seu papel na alteração da barreira cutânea é controverso na literatura. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a deleção da expressão de IL-13R α 2 em modelos de epiderme humana reconstruída para verificar seu papel na alteração da função e barreira epidérmica. Para tal, foi realizada a deleção da expressão de IL-13R α 2 em queratinócitos N/TERT utilizando CRISPR-Cas9. Os quatro clones resultantes contendo a deleção foram selecionados por PCR e caracterizados por sequenciamento genético de Sanger. Os clones foram usados para reconstrução da epiderme humana (RHE), expostos a IL-4/IL-13 e avaliados conforme sua histologia e estratificação, expressão dos receptores e de proteínas caracteristicamente alteradas na DA. O *knockout* de IL-13R α 2 gerou RHEs com redução da expressão de NELL2, tipicamente aumentadas na DA. Além disso, houve redução da expressão do receptor do tipo I, IL-2R γ enquanto ao mesmo tempo, não há alteração na expressão do receptor do tipo II, IL-13R α 1. O potencial papel de exacerbação da DA do receptor IL-13R α 2 deve ser estudado mais extensamente para ser caracterizado.

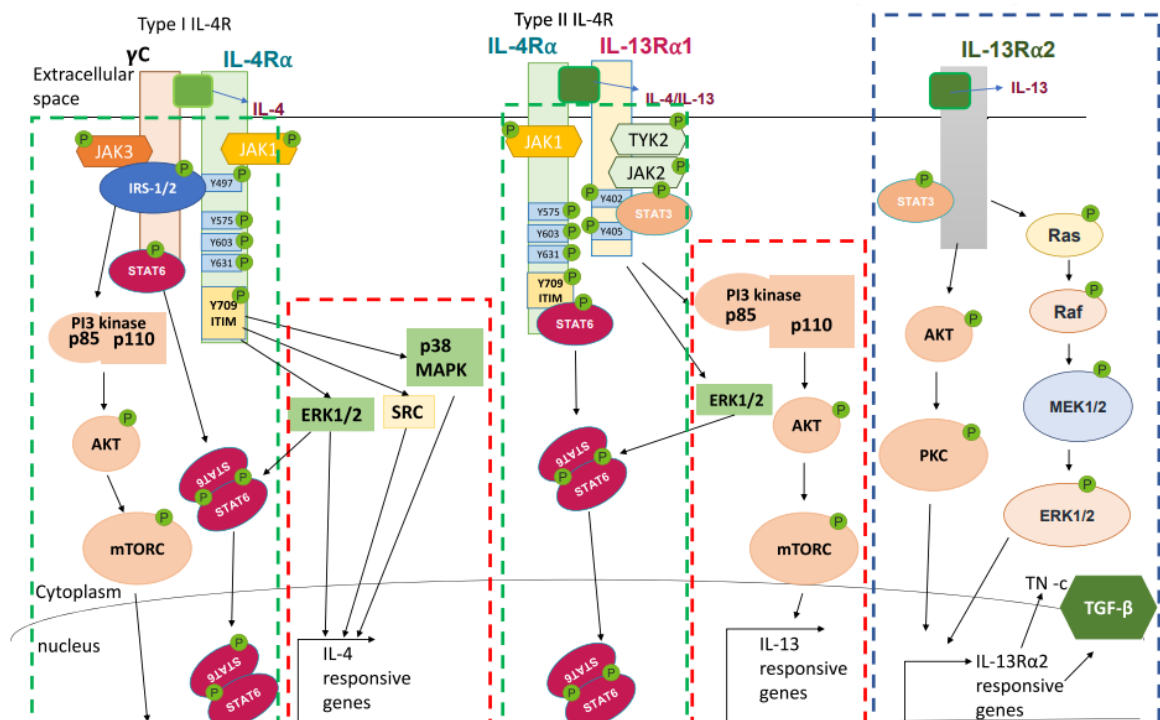
1. INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea eczematosa comum caracterizada por inflamação da pele, desregulação da resposta imune das células T auxiliares tipo 2 (Th2), destruição da barreira epidérmica e prurido crônico. Em um ciclo vicioso complexo, a resposta imune Th2 exacerbada resulta em inflamação local e liberação de interleucinas IL-4 e IL-13 que se ligam a receptores nos queratinócitos, gerando prurido e função de barreira prejudicada, o que, por sua vez, pode levar à exacerbação da resposta imune, inflamação, prurido e ruptura da barreira (Furue, 2020).

Na pele, os queratinócitos apresentam diferentes receptores para citocinas do tipo 2, que são liberadas pelas células Th2, como IL-4 e IL-13 e têm papéis críticos em doenças inflamatórias alérgicas, como a DA (Hamid et al., 1994).

Na membrana plasmática dos queratinócitos, IL-4 e IL-13 podem se ligar a três receptores diferentes, ativando diferentes vias para a inflamação e disfunção da barreira epidérmica, como mostra a Figura 1.

Figura 1. Vias de sinalização de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) em queratinócitos.



Fonte: Shankar, McAlees and Lewkowich, 2022

O receptor tipo II, composto pelas subunidades IL-4R α e IL-13R α 1 que se ligam a IL-4 e/ou IL-13, ativa as vias JAK/STAT, MAPK e PI3K/AKT. O receptor tipo I, composto pelas subunidades IL-4R α e IL-2R γ e cuja presença nos queratinócitos é controversa, é o principal receptor nas células imunes. Este receptor liga-se apenas à IL-4, mas ativa vias como as ativadas pelo receptor tipo II (Shankar, McAlees and Lewkowich, 2022). Apesar das observações de que o receptor tipo I era expresso apenas em células hematopoiéticas, estudos publicados por Prognaux e colaboradores (2023) confirmaram a expressão induzível da subunidade IL-2R γ em queratinócitos como consequência da ativação do receptor tipo II. Com uma expressão igualmente induzível, o IL-13R α 2 é um receptor que se liga apenas à IL-13 com maior afinidade do que o receptor tipo II e é considerado principalmente como um receptor *decoy*, ou seja, pelo tamanho da porção proteica citoplasmática ser muito curta, este receptor não é capaz de induzir sinalização por vias canônicas.

Embora as IL-4 e IL-13 compartilhem receptores e vias de sinalização comuns em queratinócitos, análises transcriptômicas recentes revelaram que IL-13 tem um papel dominante na pele lesional da DA em comparação com IL-4 (Tsoi et al., 2019). Portanto, sugere-se que mesmo a IL-4 sendo responsável pela resposta humoral, a IL-13 medeia as respostas teciduais centrais para a manutenção da patogênese da DA, o que torna de grande relevância os estudos sobre os receptores de IL-13, como o receptor do tipo II, que contém IL-13R α 1 e o receptor IL-13 α 2.

A expressão de IL-13 α 2 é aumentada em modelos de RHE como consequência da ativação do receptor tipo II (Prognaux et al., 2023), após a indução por IL-4 e IL-13. Apesar disso, os efeitos produzidos pela eventual ativação da IL-13 α 2 são controversos e não elucidados. A princípio, IL-13R α 2 foi considerado como capaz de reduzir a inflamação induzidas por IL-13 por meio de sua maior afinidade de ligação em comparação com a IL-13R α 1, assim diminuindo o sinal induzido no receptor tipo II. Portanto, alguns autores mostraram que a expressão aumentada de IL-13R α 2 reduz a ligação de IL-13 ao receptor IL-13R α 1, que tem capacidade de ativar vias inflamatórias diretamente (Kasaian et al., 2011; Ranasinghe et al., 2014; Chandriani et al., 2014; Ulzii et al., 2019). Assim, quando há a deleção de IL-13R α 2 em camundongos, as respostas induzidas por IL-13 estão aumentadas (Wood et al., 2003; Sivaprasad et al., 2010). Por outro lado, alguns autores descrevem um papel oposto, no qual com a deleção de IL-

IL-13R α 2 ocorre redução da resposta a IL-13 (Chen et al. 2013; Hall et al., 2017) e que a superexpressão de IL-13R α 2 aumenta a inflamação (Chen et al., 2013).

As vias de sinalização ativadas por IL-13R α 2 podem ser alternativas aos receptores tipo I ou II. Como mostrado na Figura 1, a ativação da sinalização dependente de IL-13R α 2 pode envolver RAS/RAF, ERK, proteína ativadora-1 (AP-1), C-Jun, STAT3 e induzir a produção de TGF- β através de AP-1 (Shankar, McAlees e Lewkowich, 2022).

Embora a ativação de IL-13R α 2 seja relatada em vários modelos tumorais (Zhao et al., 2015; Newman et al., 2017; Fujisawa et al., 2021) e outras doenças inflamatórias de característica Th2, seu papel na dermatite atópica é ainda incerto. Portanto, o presente capítulo aborda uma deleção em IL-13R α 2 para verificar o papel do receptor na alteração da função barreira em RHEs.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência do receptor IL-13R α 2 na alteração de barreira epidérmica em modelos de epiderme humana reconstruída através de sua deleção gênica frente ao estímulo inflamatório do tipo Th2 característico de dermatopatias eczematosas, como a DA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi realizado durante o doutorado sanduíche na Universidade de Namur, sob orientação do Prof. Yves Poumay e apoio da doutora Audrey Proagneaux.

3.1. Cultura de células e epiderme humana reconstruída

Conforme descrito por Progneaux (2023), os queratinócitos N/TERT imortalizados foram doados do Laboratório de Rheinwald (Dickson et al., 2000). A autenticidade das células foi avaliada na ATCC (Manassas, VA) (<http://www.atcc.org>) por comparação de um frasco original congelado de células com células N/TERT cultivadas atuais (Bertrand-Vallery et al., 2010). Os queratinócitos foram cultivados em meio Epilife® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e suplementados com HKGS (Cascade Biologics, Portland, Oregon, EUA), penicilina 50 U/ml e estreptomicina 50 μ g/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) até atingir a confluência para reconstruir a epiderme humana em filtros de policarbonato durante 11 dias. Após a maturação, as RHE foram incubadas com IL-4

(50 ng/ml) e IL-13 (50 ng/ml) (PreproTech, New Jersey, EUA) por 48h para as técnicas de Imunofluorescência e RT-qPCR, enquanto para Western Blotting, a exposição foi realizada por 15 minutos.

3.2. Inativação de IL13RA2 por CRISPR-Cas9 em queratinócitos

IL13RA2 (localização citogenética Xq24) foram inativados em queratinócitos N/TERT imortalizados usando o método CRISPR-Cas9 conforme descrito por Progneaux *et al.* (2023) e Evrard *et al.* (2021). Em resumo, duplas de crRNA transativadores de RNA CRISPR (crRNA) foram formadas misturando crRNA (200 mM) e crRNA transativador (200 mM, #1072532; Integrated DNA Technologies). A hibridização foi realizada aquecendo a mistura até 95°C por 5 minutos e depois resfriando-a até a temperatura ambiente. Quatro crRNAs foram projetados, as sequências de oligonucleotídeos estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. sgRNA usado para edição gênica por CRISPR-Cas9 (adquiridos na empresa Integrated DNA Technologies, Bélgica).

sgRNA	Sequência (5' – 3')	PAM	Strand
IL13RA2 exon 4	GGATACTTAGGTTATCTCTA	CCC	<i>Reverse</i>
IL13RA2 exon 4	ATGGCAACCCCCACTGTCTC	TGG	<i>Forward</i>
IL13RA2 exon 10	ATCGAAGAAAACCTTTGCTAC	CCT	<i>Reverse</i>
IL13RA2 exon 10	CTACGTTTCTGGCTACCATT	TGG	<i>Forward</i>

As duplas foram então misturadas à enzima Cas9 (#1081058; Integrated DNA Technologies) para formar complexos de ribonucleoproteínas, que foram eletroporados (dispositivo Amaxa Nucleofector I, #AAD-1001; Lonza, Suíça) em queratinócitos N/TERT proliferativos de acordo com as instruções do fabricante (Kit Amaxa Human Keratinocyte Nucleofector de Lonza, #VAPD-1002). Após 48 horas de recuperação, as células editadas foram semeadas em placas de 96 poços em baixa densidade para obter populações clonais (diluição limitante).

Após seleção clonal, os clones receberam números crescentes e foram amplificados e analisados por PCR. Os clones apresentando produtos de PCR compatíveis com uma deleção no gene IL13RA2 foram caracterizadas por sequenciamento de Sanger. Seguindo as instruções do fabricante, utilizamos o Kit Mixn2Seq (Eurofins, Gembloux,

Bélgica), que foi enviado à empresa Eurofins para o sequenciamento. Os primers de PCR usados a 10 μ M estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Primers usados para amplificação e sequenciamento genético dos clones com deleção em IL13RA2 (adquiridos na empresa Eurogentec, Bélgica).

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Strand</i>
IL13RA2 exon4	ACCTCCTCAGGATTTTGAGA	<i>Forward</i>
IL13RA2 exon10	CCCACAGCGAACAAGCAAAA	<i>Reverse</i>

3.3. Histologia com Hematoxilina e Eosina e Imunofluorescência

Os equivalentes de epiderme foram fixados em formalina acética (10%), em temperatura ambiente por 24 horas, desidratadas em série crescente de concentração de álcoois e embebidas em parafina histológica. Os blocos de parafina contendo as amostras foram cortados em secções de 6 μ m. Para analisar histologicamente a sua morfologia e diferenciação de camadas epidérmicas, as lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina.

A avaliação funcional da presença de marcadores de diferenciação nas epidermes foi feita por imunofluorescência. A recuperação antigênica das amostras foi realizada com tampão citrato 10mM pH6,0 em banho-maria por 20 minutos. Após o resfriamento, foi realizado o bloqueio inespecífico com soro de cabra 3% em PBS por 1 hora, em temperatura ambiente. As amostras foram incubadas overnight em geladeira (4° C) com os anticorpos primários CK10 (*mouse*, diluição 1:100, código M7002, Dako, Dinamarca) e Filagrina (*mouse*, diluição 1:100, código MA5-13440, Invitrogen, ThermoScientific, Massachusetts, EUA). Por fim, foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (A11001, Invitrogen, ThermoScientific, Massachusetts, EUA) e Hoesch (ThermoScientific, Massachusetts, EUA) por 15 minutos.

3.4. Extração de RNA e RT-qPCR

A extração de RNA de RHE foi realizada usando ReliaPrep™ (*miRNA Cell and Tissue Miniprep System*, Promega, Wisconsin, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza e concentração de RNA foram medidas por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A transcrição reversa foi realizada usando o *kit SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase Kit* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O cDNA foi amplificado usando Takyon™ No ROX

Probe 2X MasterMix dTTP (cat nº UF-NSMT-B0701, Eurogentec, Liège, Bélgica) e primers específicos (300 nM) (Eurogentec, Liège, Bélgica) listados na Tabela 3.

A fluorescência de SYBRgreen foi monitorada através do LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Bélgica). A expressão quantitativa relativa de mRNA foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Tabela 3. Primers usados no RT-qPCR.

Genes de interesse	Sequência <i>forward</i>	Sequencia <i>reverse</i>	Empresa
RPLP0	ATCAACGGGTACAA ACGAGTC	CCTTCTTGGCTGA TCCATCTG	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
IL-13R α 1	ACCCGAGGGAGCC AGCTCA	GTGGGGTCCCAGT GTAGCACC	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-13R α 2 'out' - exon 3	TGCTTGGCTATCGGATGCTT	TCCGGGATCCACTATCTCAA	Eurogentec, Liège, Belgium
IL-13R α 2 'in' - exon 8	ATACCTTTGGGACC TATTCC	ACTTGTAACCGG TACTGAC	Eurogentec, Liège, Belgium
CA2	AACAATGGTCATGC TTTCAACG	ACAGGTAGTTCAC TTGGGGTC	Eurogentec, Liège, Belgium
NELL2	TAAGGGTATAATGC AAGATGTCCAATT	TCTAGACCCGTGA CTCGTTATTT	Eurogentec, Liège, Belgium
LOR	TCATGATGCTACCC GAGGTTTG	GTCTTGATCTACG TCGGCCTCT	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
FLG	GGGCACTGAAAGG CAAAAAG	CACCATAATCATA ATCTGCACTACCA	Sigma-Aldrich, Missouri,USA
IL-2R γ	GCAGAAACGCTAC ACGTTTCG	GTGGATTGGGTGG CTCCAT	Eurogentec, Liège, Belgium

3.5. Extração proteica e Western Blotting

A partir de amostras de RHE, as extrações de proteínas para Western Blotting (WB) foram preparadas em tampão Laemmi concentrado 2x (62,5 mM tris-HCl, 2% SDS, 8,7% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 0,2% ditioneitol). Os lisados foram fervidos a 100°C por 5 minutos e vortexados para se separar a epiderme do filtro. As amostras foram carregadas em gel de poliacrilamida e transferidos para membrana PVDF (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). A membrana é bloqueada com BSA 5% diluído em TBS-Tween 20 (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,1% Tween-20) por 1 hora e adicionado o anticorpo anti pSTAT6 (1/1000, #9361, Cell signaling, Leiden, Netherlands). A revelação foi realizada através do sistema ImageQuant Las4000mini (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra) após incubação de membrana em solução de quimioluminescência (Roche Diagnosis, Vilvoorde, Bélgica).

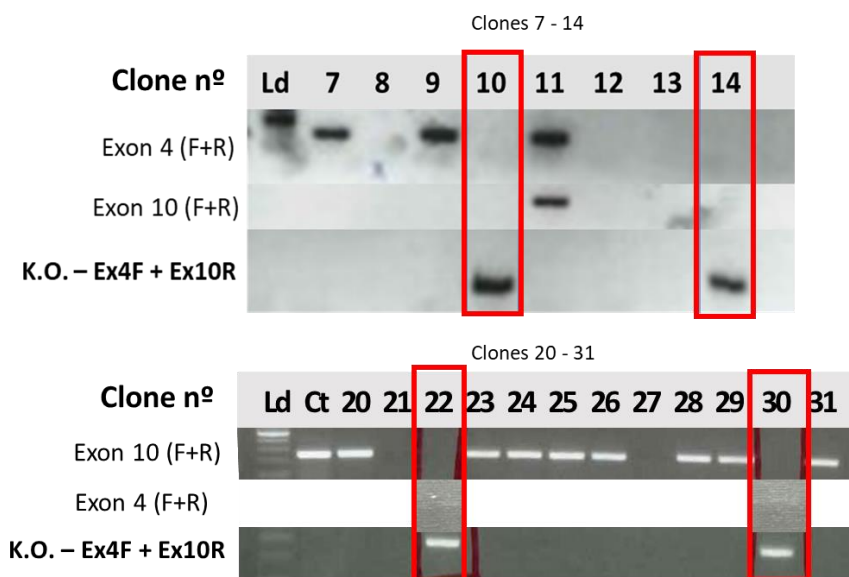
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência do receptor de IL-13, denominado IL-13R α 2, apresenta potencial para alterar a função barreira epidérmica. Quando queratinócitos são expostos às interleucinas Th2, IL-4 e IL-13, há aumento da expressão de IL-13R α 2 (Shankar, McAlles, Lewkowich, 2022). Dessa maneira, estudar a sua deleção genética pode auxiliar a elucidar seu papel em doenças eczematosas, como a dermatite atópica. Para tal, modelos de epiderme humana reconstruídas (RHEs) podem ser induzidas *in vitro* a apresentar características compatíveis com a dermatite atópica, como menor função barreira e inflamação (De Vuyst et al., 2017).

O gene IL-13R α 2 é localizado no cromossomo X, assim o genótipo masculino das células N/TERT permitiram a inativação do gene de maneira facilitada em comparação com genes localizados em ambos os cromossomos sexuais (feminino) ou somáticos. Então, os exons 4 e 10 foram selecionados para realizar o nocaute do gene IL-13R α 2, usando sgRNA pela técnica de CRISPR-Cas9. Após o tratamento dos queratinócitos imortalizados N/TERT, a diluição dos clones em placas de 96 poços foi efetuada, permitindo que através da seleção clonal obtivéssemos aproximadamente 30 clones com potencial de apresentar a deleção esperada.

Para avaliar os clones, o RNA da cultura celular de 18 clones diferentes foi extraído, convertido em cDNA e amplificado para verificar os produtos correspondentes a conter ou não as regiões gênicas que caracterizariam a deleção do gene IL-13R α 2, ou seja, a não conter a região reversa do exon 4 e a região dianteira do exon 10. Assim, os queratinócitos seriam considerados com sucesso no *knockout* de IL-13R α 2 quando o PCR revelasse os produtos da amplificação das regiões do exon 4 *forward* (F) e do exon 10 *reverse* (R) na mesma amostra, demonstrados a seguir na Figura 2. Apresentaram estas características quatro clones distintos, chamados por sua numeração sequencial como clone 10, 14, 22 e 30.

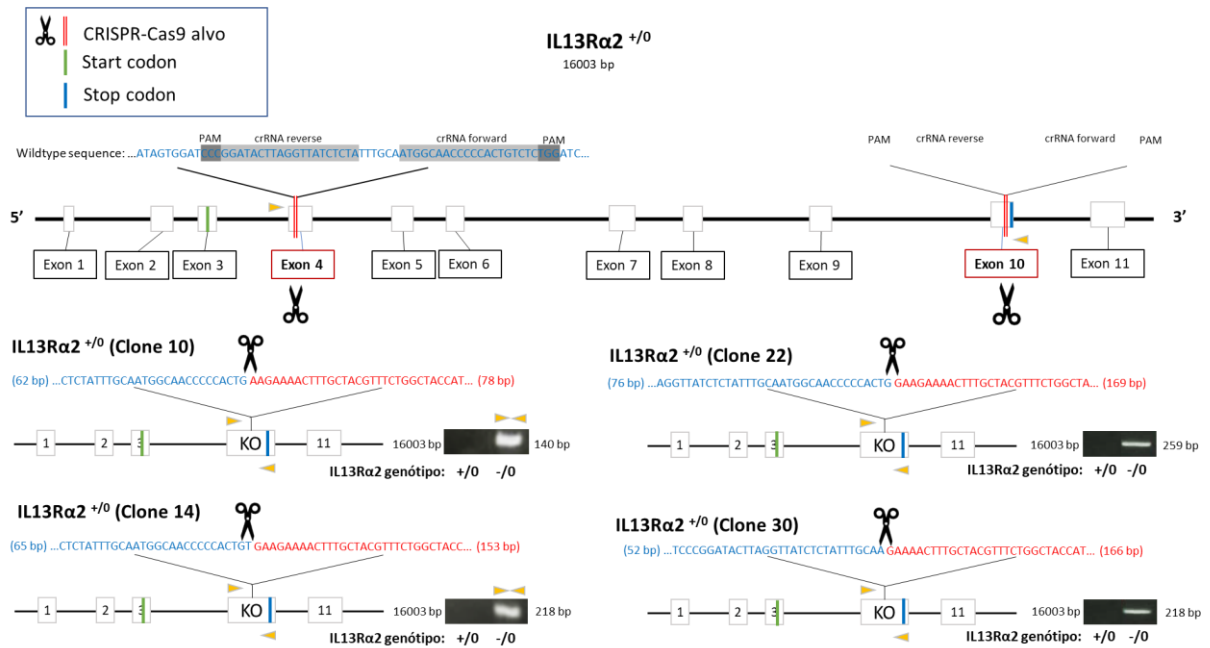
Figura 2. Expressão dos produtos de amplificação das regiões correspondentes ao exon 4 e exon 10 dos clones 7-14 e 20-31 por PCR.



Então, o RNA dos clones selecionados (10, 14, 22 e 30), foram novamente convertidos a cDNA e amplificados nas regiões do gene *IL-13R α 2*, especificamente na sequência do exon 4 *forward* e exon 10 *reverse*, e os produtos deste PCR foram enviados para o sequenciamento genético de Sanger realizado pela empresa Eurogentec.

Após analisar os resultados, as sequências genéticas dos clones selecionados foram sobrepostas à sequência do gene *IL-13R α 2* sem alterações (*Wildtype sequence*) para avaliar se as regiões em que houve os cortes do CRISPR/Cas-9 seriam correspondentes as regiões dos exons 4 e 10, além de permitir avaliar como ficou a sequência resultante da deleção por CRISPR e se os clones poderiam ser réplicas entre si mesmos.

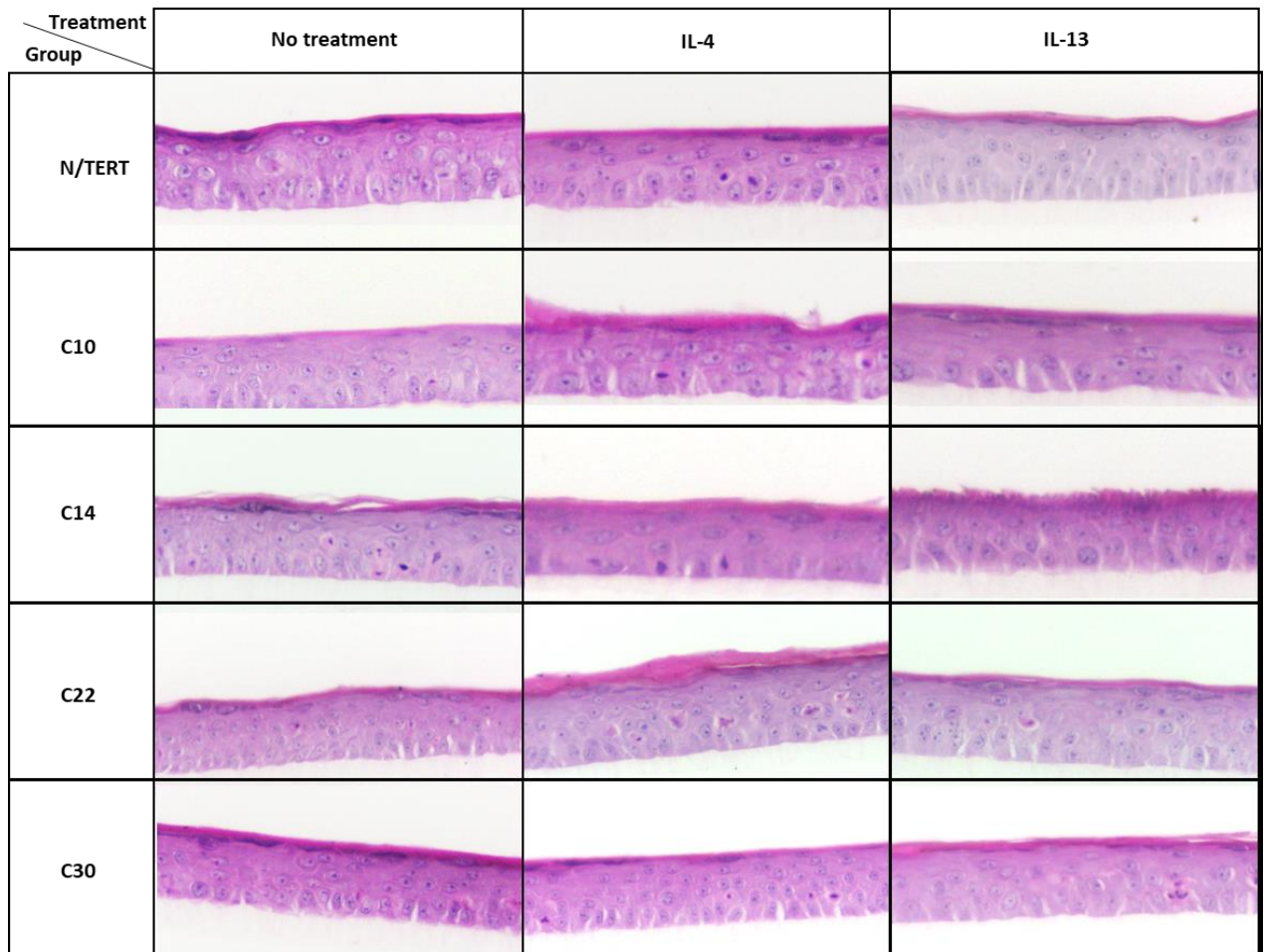
Figura 3. Deleções do gene IL13RA2 usando o método de CRISPR/Cas9 em queratinócitos de linhagem N/TERT e genotipagem dos clones com a deleção alvo.



Como demonstrado na Figura 3, os clones 10, 14, 22 e 30 apresentaram a deleção entre o exon 4 e exon 10, o que faz com que a proteína a ser traduzida não seja funcional, e que os clones entre si sejam distintos, contendo diferentes tamanhos e sequências de pares de base. O clone 10 é o que apresentou menor tamanho entre os clones, com 140 pares de bases. Os clones 14 e 30 apresentaram o mesmo número de 218 pares de base, porém a suas deleções e sequências resultantes são distintas. O clone 22 é o que apresentou maior tamanho, com 259 de pares de bases. Portanto, foram caracterizadas quatro amostras diferentes para a construção dos modelos de RHE e verificação dos efeitos da deleção de IL13RA2 para a barreira cutânea da epiderme.

Assim, os modelos de epiderme humana foram reconstruídos utilizando os queratinócitos correspondentes aos clones contendo a deleção do gene IL-13R α 2 em comparação com os queratinócitos sem alteração genética (grupo controle, chamado de N/TERT). A partir disso, inicialmente foi avaliada a morfologia destas RHEs após tratamento com IL-4 e IL-13 por 48h nas RHE completamente estratificadas (11 dias) por histologia.

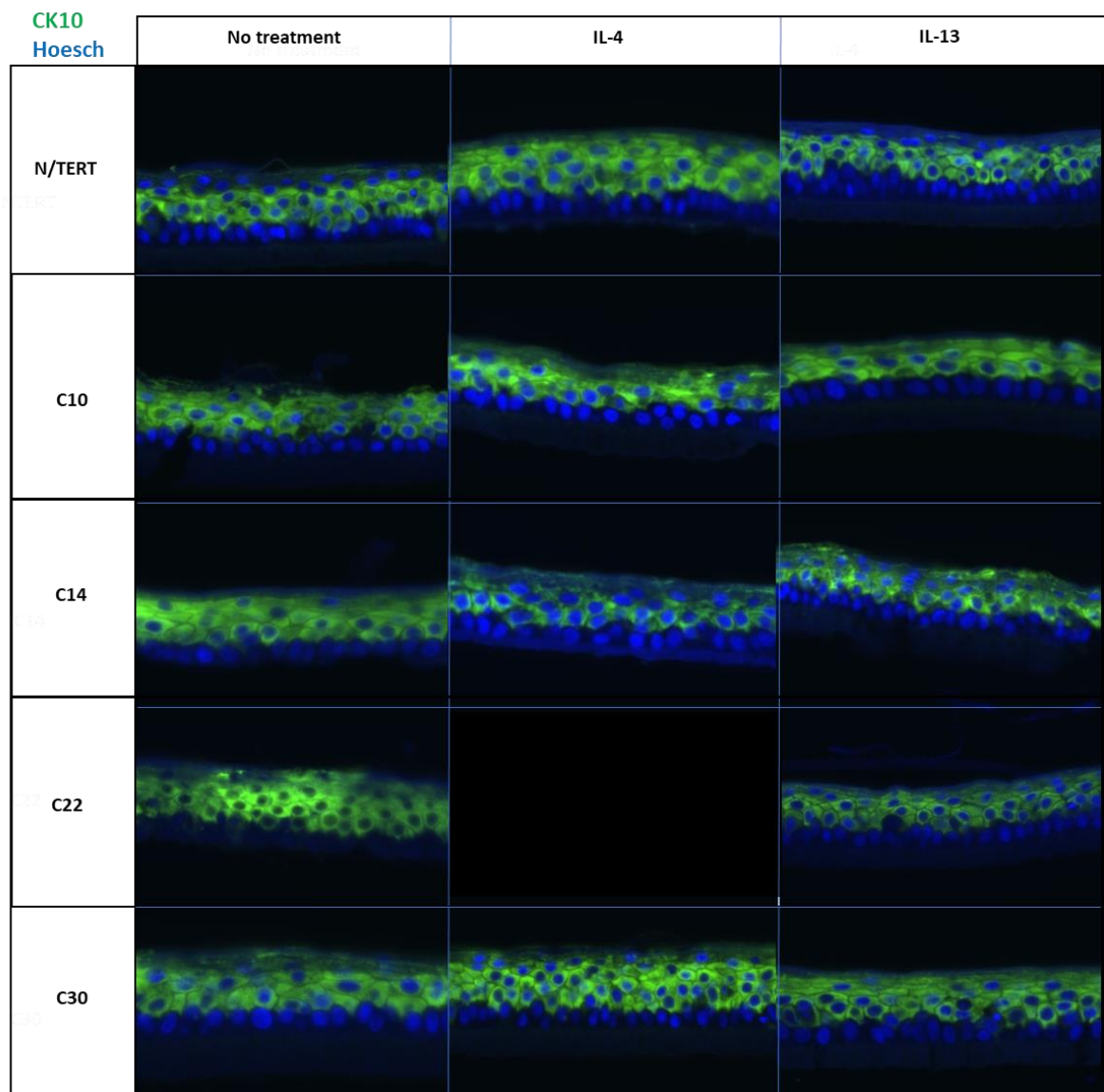
Figura 4. Cortes histológicos em parafina coradas com hematoxilina e eosina da epiderme humana reconstruída (RHEs) a partir dos queratinócitos N/TERT em comparação com os clones com deleção em IL13R α 2 sob tratamento com IL-4 ou IL-13 por 48 horas.

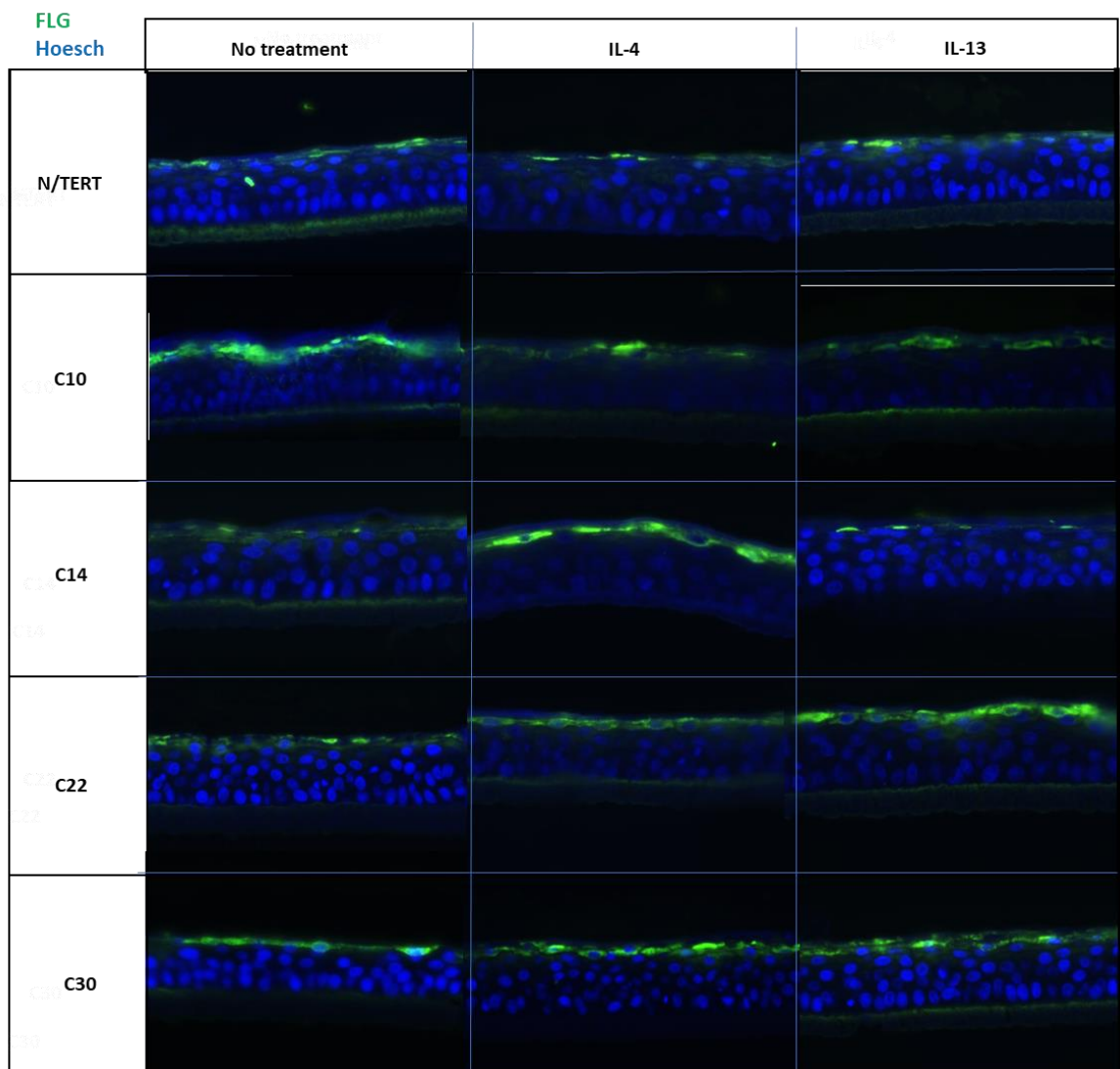


As RHE apresentaram diferenciação e estratificação dos queratinócitos, desde a camada basal à córnea de forma característica à esperada nas células imortalizadas N/TERT. Em resumo, estas apresentam na camada basal, células arredondadas com núcleo evidente que diferentemente de células primárias, se reduzem conforme avançam nas camadas suprabasais. O achatamento esperado dos queratinócitos e a formação de grânulos de querato-hialina são visíveis nas camadas granulosa, anterior à camada córnea, que se apresenta anucleada e fina.

Na Figura 5, a imunofluorescência nos permite verificar a presença de citoqueratina 10 nas camadas suprabasais, demonstrando a estratificação deste modelo de epiderme. Além disso, podemos verificar a presença de filagrina de forma difusa entre as RHE no estrato córneo, o que caracteriza a diferenciação final da epiderme na formação do estrato córneo.

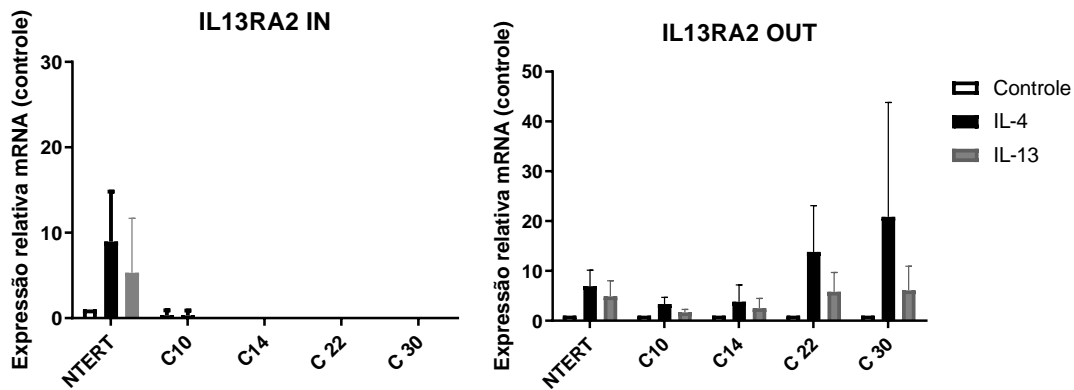
Figura 5. Imunofluorescência dos modelos de epiderme humana reconstruída a partir dos queratinócitos N/TERT em comparação com os clones com deleção em IL13R α 2 sob tratamento com IL-4 ou IL-13 por 48 horas com marcação de proteínas de estratificação citoqueratina 10 (CK10) e de diferenciação terminal filagrina (FLG). Os núcleos são corados em azul com Hoesch.





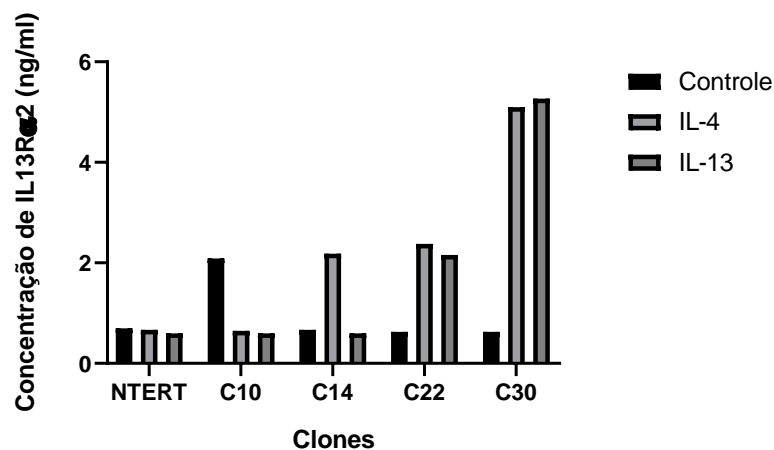
Para ter certeza da deleção do gene IL13RA2 verificou-se a expressão de mRNA que codifica a sequência do exon 3 (OUT) e exon 8 (IN) deste gene. Como esperado, devido ao sequenciamento genético dos clones selecionados, os clones com deleção no gene IL13RA2 não apresentaram expressão de mRNA na localização da deleção, correspondente ao exon 8, chamada de 'IN', Figura 6. Porém, apresentou expressão de mRNA correspondente ao exon 3, localizado na região anterior à deletada, denominado como 'OUT'. Portanto, a tradução da proteína IL13RA2 de forma truncada, ou seja, contendo a deleção correspondente, ainda seria esperada. Porém, essa ocorreria resultando em uma proteína não funcional, pois esta não conteria a região de anexo à membrana plasmática, assim como outras regiões funcionais.

Figura 6. Expressão de mRNA do receptor IL13RA2 referentes a sequência localizada dentro do local da deleção (IN – exon 8) e fora da deleção (OUT – exon 3) foram avaliados através de RT-qPCR. RPLP0 foi usado como gene de referência. Os valores são expressos em relação ao controle interno de cada grupo (clones) e tratamento (ILs).



Quando há a tradução da IL13RA2 em proteínas truncadas, esta é exocitada ao meio extracelular. Para confirmar a presença desta proteína de forma não funcional foi quantificada a quantidade de IL13RA2 no meio sobrenadante das culturas das epidermes humanas reconstruídas, Figura 7.

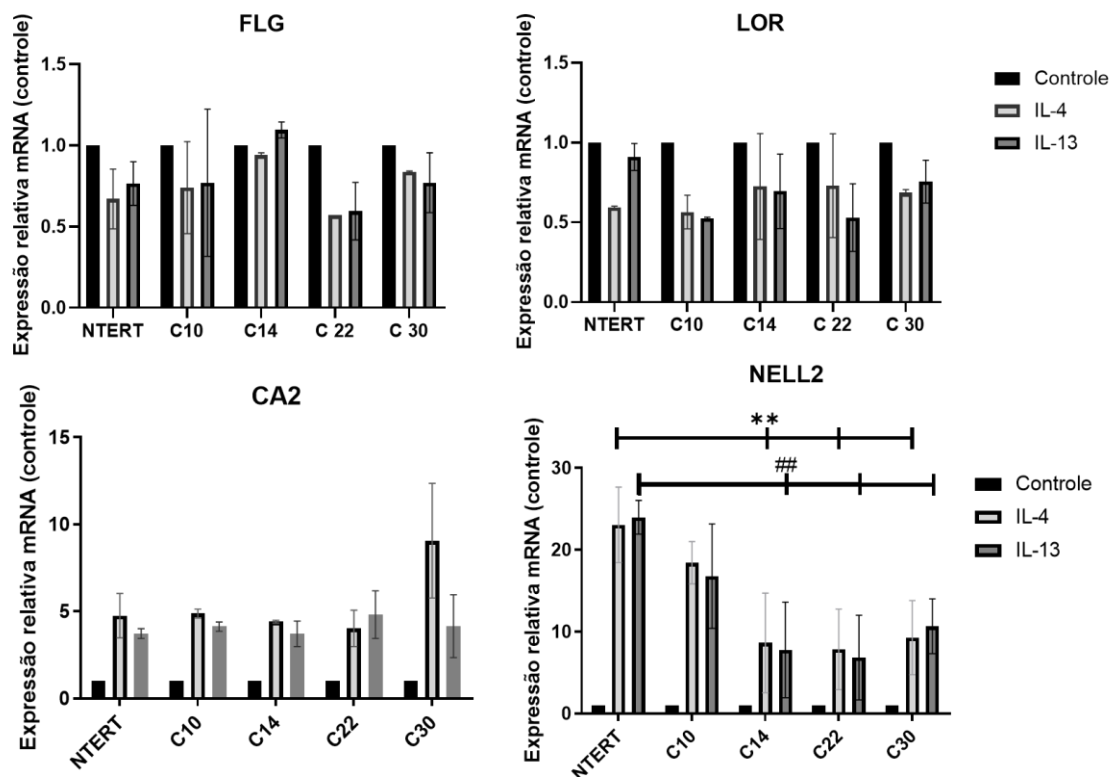
Figura 7. Quantificação de IL13RA2 por ELISA coletada do meio de cultura após o tratamento com IL-4 e IL-13 por 48h na cultura das epidermes humanas reconstruídas.



Assim, pôde-se confirmar a hipótese levantada anteriormente de que a deleção do gene IL13RA2 foi bem-sucedida, apesar de resultar na tradução de uma proteína truncada não funcional, que é exocitada ao meio de cultura das epidermes contendo a deleção gênica.

A enzima anidrase carbônica 2 (CA2) está envolvida na manutenção do pH celular, transporte de água e homeostase de íons. Portanto, está envolvida com alterações patológicas características da DA, como a espongirose. O *neural epidermal growth factor-like 2*, NELL2, é uma proteína citoplasmática que contém o domínio de repetição semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF-like). O papel fisiopatológico da NELL2 na DA ainda não foi elucidado. No entanto, sabe-se que a expressão de NELL2 é fortemente aumentada frente ao estímulo por citocinas Th2 (IL-4 e IL-13), semelhante ao que ocorre com a expressão de CAII, e está aumentada em lesões de DA. Assim, CAII e NELL2 são considerados marcadores moleculares epidérmicos de DA (Kamsteeg et al., 2010; Kamsteed et al., 2011; Seo et al., 2019).

Figura 8. Expressão de mRNA das proteínas CA2, NELL2, LOR e FLG foram avaliados através de RT-qPCR. RPLP0 foi usado como gene de referência. Os valores são expressos em relação ao controle interno de cada grupo (clones) e tratamento (ILs).

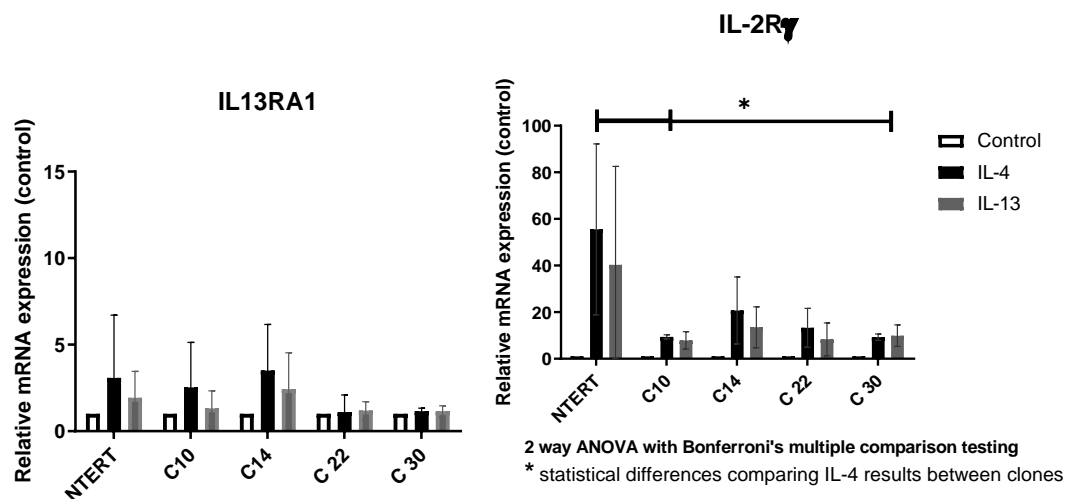


Legenda: ANOVA 2 vias com teste *post-hoc* de multipla comparação de Bonferroni
 ** diferença estatística comparando IL-4 entre os clones ($P < 0,0021$)
 ## diferença estatística comparando IL-13 entre os clones ($P < 0,0021$)

Apesar de não haver nenhuma alteração relevante na expressão de filagrina, loricrina e CA2, podemos observar que NELL2 teve redução na expressão de mRNA em relação ao controle nos clones C14, C22 e C30 submetidos tanto ao tratamento por 48h com IL-4 quanto com IL-13 ($p < 0,0021$). Apesar de não ser elucidado o papel de NELL2 na DA, sua característica em estar aumentado com o tratamento de IL-4 ou IL-13 é bem estabelecida na literatura. E assim, podemos constatar que o *knockout* de IL13R α 2 torna os clones menos responsivos ao tratamento com IL-4 e IL-13 em relação ao NELL2, o aproximando a uma característica mais semelhante à pele normal. De acordo com a sua função em neurônios, existe a hipótese de que NELL2 está aumentado em pele com dermatite atópica pois está relacionado com a maior expressão de fibras nervosas na epiderme, característica encontrada na pele lesional na DA, responsável por gerar maior prurido, que pela ação de coçar a região, ativa a consequente inflamação cíclica da DA (Kamsteeg et al, 2010). Assim, uma redução em NELL2 apresenta potencial promissor para reduzir a ativação do ciclo inflamatório clássico da DA.

A expressão dos outros receptores relacionados à resposta Th2 na DA também foram avaliados. A partir da Figura 9, podemos verificar uma expressão reduzida de IL-2R γ , característica do receptor do tipo I, em todos os clones em relação às RHE controle, sem *knockout* em IL-13R α 2, e com diferença significativa nos clones 10 e 30 ($p < 0,017$).

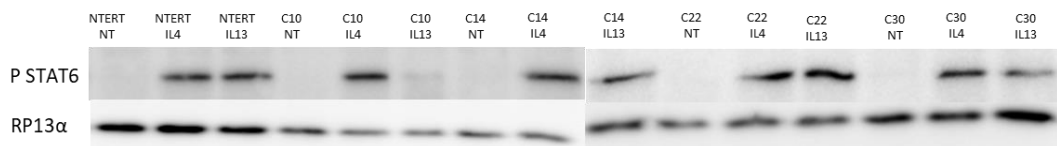
Figura 9. Expressão de mRNA dos receptores do tipo I (IL-2R γ) e II (IL-13R α 1) foram avaliados através de RT-qPCR. RPLP0 foi usado como gene de referência. Os valores são expressos em relação ao controle interno de cada grupo (clones) e tratamento (ILs).



A subunidade IL-2R γ , que forma o receptor tipo I, é ativado em sequência à ativação do receptor tipo II, composto por IL-4R α /IL-13R α , após o estímulo das citocinas IL-13 e IL-4. Este resultado se correlaciona com o descrito por Progneaux e colaboradores (2023) em que foi realizado o *knockout* no receptor de IL-2R γ para inibir a ativação do receptor do tipo I, e como consequência, houve o aumento significativo na expressão de IL-13R α 2, indicando que estes receptores podem estar correlacionados. Em concordância com esse estudo, os resultados observados demonstram que a partir da deleção de IL-13R α 2, há alteração na expressão de IL-2R γ . Porém, diferentemente do observado por Progneaux (2023) na qual esta relação ocorre de forma inversamente proporcional, no presente estudo foi observada uma diferença diretamente proporcional, já que com a inibição de IL-13R α 2, houve redução da expressão de IL-2R γ . Este resultado é muito interessante, pois diferente do receptor IL-13R α 2, o receptor do tipo I é capaz de ativar uma sinalização canônica direta via STAT6 e PI3K *downstream*, que é comprovada em gerar alterações na barreira cutânea. Assim, com a deleção do receptor IL-13R α 2 e redução da expressão de IL-2R γ , é muito provável que tenhamos menor ativação de STAT6 e PI3K e menor ativação da resposta de redução na função barreira.

Então, foi analisada a ativação de STAT-6 por sua fosforilação (P-STAT6) nos modelos de RHEs controle (NTERT) e clones 10, 14, 22 e 30 após a indução por 15 minutos da ativação das vias inflamatórias através do tratamento com IL-4, IL-13 ou sem tratamento (NT), na Figura 10.

Figura 10. Expressão proteica por Western Blotting da ativação de STAT6 (p-STAT6) nas RHE controle (NTERT) e clones 10, 14, 22 e 30 após tratamento com IL-4, IL-13 ou não-tratado (NT).



Legenda: NTERT (RHE Controle); C10 (Clone 10); C14 (Clone 14); C22 (Clone 22); C30 (Clone 30); NT (não-tratado); IL-4 (tratado com IL-4); IL-13 (tratado com IL-13); RP13 α (proteína ribossômica L13P – proteína de expressão controle endógena)

Porém, como mostra a Figura 10, a menor expressão de mRNA de IL-2R γ não diminui a ativação de STAT6. Isso é somente observado no clone 10 quando tratado com IL-13, porém nos outros clones isso não ocorre. Com a IL-4, nenhuma alteração em algum

dos clones é observada. Portanto, maiores investigações sobre as vias ativadas após o tratamento com IL-4 e IL-13 nas RHE nocaute de IL-13R α 2 são necessárias.

Ainda assim, é importante mencionar que após a inibição do receptor tipo I pelo nocaute em IL-2R γ , o receptor IL-13R α 2 tem expressão aumentada. Mesmo assim, nenhuma diferença nos marcadores de DA é resultado, tanto em NELL2 quanto CA2 (Progneaux et al., 2023). Por outro lado, quando inibimos o receptor IL-13R α 2, e há consequente redução da expressão de IL-2R γ , observamos uma redução em NELL2.

Portanto, a deleção do receptor IL-13R α 2 resulta numa redução na expressão do receptor do tipo I, enquanto ao mesmo tempo, não há alteração na expressão do receptor do tipo II, IL-13R α 1, e há redução na expressão de NELL2, apontando para um potencial papel de exacerbação da DA pelo receptor IL-13R α 2. Este resultado concordaria com os observados por Hall *et al.* (2017), Zhou *et al.* (2015) e Verstockt *et al.* (2018), que observaram um pior prognóstico inflamatório sobre o receptor de IL-13R α 2 em diferentes doenças. Mais estudos são recomendados para elucidar o papel da IL-13R α 2 para a alteração da barreira cutânea e envolvimento com a DA.

5. CONCLUSÃO

Os clones contendo a deleção em IL-13R α 2 foram usados para reconstrução da epiderme humana (RHE) e mesmo expostos a IL-4 ou IL-13 permitiram a estratificação das RHE. As RHE com nocaute de IL-13R α 2 apresentaram redução da expressão de NELL2, caracteristicamente aumentadas na DA. Além disso, houve redução da expressão do receptor do tipo I, IL-2R γ , enquanto ao mesmo tempo, não há alteração na expressão do receptor do tipo II, IL-13R α 1. Por fim, o potencial papel de exacerbação da DA do receptor IL-13R α 2 deve ser estudado mais extensamente para ser caracterizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTRAND-VALLERY, Véronique et al. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16 INK-4A. *Biogerontology*, v. 11, p. 167-181, 2010.

- CHANDRIANI, Sanjay et al. Endogenously expressed IL-13R α 2 attenuates IL-13-mediated responses but does not activate signaling in human lung fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 1, p. 111-119, 2014.
- CHEN, Weiguo et al. IL-13 receptor α 2 contributes to development of experimental allergic asthma. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 132, n. 4, p. 951-958. e6, 2013.
- DE VUYST, Evelyne et al. Methyl- β -cyclodextrin concurs with interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 4, p. 435-437, 2018.
- DE VUYST, Evelyne et al. Atopic dermatitis studies through in vitro models. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 119, 2017.
- DICKSON, Mark A. et al. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16INK4a-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 4, p. 1436-1447, 2000.
- EVRARD, Céline et al. Deletion of TNFAIP6 gene in human keratinocytes demonstrates a role for TSG-6 to retain hyaluronan inside epidermis. **JID Innovations**, v. 1, n. 4, p. 100054, 2021.
- FUJISAWA, Toshio et al. A novel role of Interleukin 13 receptor alpha2 in perineural invasion and its association with poor prognosis of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1294, 2020.
- FURUE, Masutaka. Regulation of filaggrin, loricrin, and involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: pathogenic implications in atopic dermatitis. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 15, p. 5382, 2020.
- HAMID, Q. et al. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. **The Journal of clinical investigation**, v. 94, n. 2, p. 870-876, 1994.
- HALL, Sara L. et al. IL-17A enhances IL-13 activity by enhancing IL-13-induced signal transducer and activator of transcription 6 activation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 2, p. 462-471. e14, 2017.
- HALL, Sara L. et al. IL-17A enhances IL-13 activity by enhancing IL-13-induced signal transducer and activator of transcription 6 activation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 2, p. 462-471. e14, 2017.
- KAMSTEEG, M. et al. Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis. **British journal of dermatology**, v. 162, n. 3, p. 568-578, 2010.
- KASAIAN, Marion T. et al. IL-13 antibodies influence IL-13 clearance in humans by modulating scavenger activity of IL-13R α 2. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 561-569, 2011.

NEWMAN, Jennifer P. et al. Interleukin-13 receptor alpha 2 cooperates with EGFRvIII signaling to promote glioblastoma multiforme. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1913, 2017.

PROGNEAUX, Audrey et al. Keratinocytes activated by IL-4/IL-13 express IL-2R γ with consequences on epidermal barrier function. **Experimental dermatology**, v. 32, n. 5, p. 660-670, 2023.

RANASINGHE, Charani et al. IL-4 and IL-13 receptors: Roles in immunity and powerful vaccine adjuvants. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 4, p. 437-442, 2014.

SEO, Hee-Seok et al. Adiponectin attenuates the inflammation in atopic dermatitis-like reconstructed human epidermis. **Annals of Dermatology**, v. 31, n. 2, p. 186-195, 2019.

SHANKAR, Archana; MCALEES, Jaclyn W.; LEWKOWICH, Ian P. Modulation of IL-4/IL-13 cytokine signaling in the context of allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 150, n. 2, p. 266-276, 2022.

SIVAPRASAD, Umasundari et al. IL-13R α 2 has a protective role in a mouse model of cutaneous inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 11, p. 6802-6808, 2010.

TSOI, Lam C. et al. Atopic dermatitis is an IL-13–dominant disease with greater molecular heterogeneity compared to psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 7, p. 1480-1489, 2019.

ULZII, Dugarmaa et al. Scratching counteracts IL-13 signaling by upregulating the decoy receptor IL-13R α 2 in keratinocytes. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3324, 2019.

VERSTOCKT, Bram et al. Effects of epithelial IL-13R α 2 expression in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2983, 2018.

WOOD, Nancy et al. Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor α 2. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 6, p. 703-709, 2003.

ZHOU, Yang et al. Chitinase 3–like–1 and its receptors in Hermansky-Pudlak syndrome–associated lung disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 8, p. 3178-3192, 2015.