

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Desenvolvimento de um modelo de epiderme 3D inflamada, *in vitro*, para avaliar a eficácia de compostos anti-inflamatórios

Madalena Celeiro Rei

Mestrado em Biologia Humana e do Ambiente

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Abel Oliva
Professora Doutora Deodália Dias

2022

Agradecimentos

Várias pessoas contribuíram para a chegada deste momento. A todas elas, agradeço profundamente por terem impactado o meu percurso, direta ou indiretamente, e por me terem permitido crescer com os seus conselhos e ensinamentos.

Ao meu orientador, Doutor Abel Oliva, por me ter aberto as portas do seu laboratório para que pudesse desenvolver o meu projeto de dissertação, pela confiança depositada em mim, pela atenção e disponibilidade, pela liberdade que concede aos seus alunos para que desenvolvam um ritmo de trabalho próprio e para que possam aprender com os erros, inculcando sempre um espírito de resiliência.

À minha coorientadora, Doutora Deodália Dias, por sempre ter mostrado a maior disponibilidade e amabilidade, pelo apoio e preocupação para que tudo corresse pelo melhor, pelas palavras de incentivo e pela confiança que transmite.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), por me ter proporcionado a oportunidade de aprender com profissionais fantásticos e apaixonados pela Biologia. Ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier (ITQB), por me ter acolhido da melhor forma possível e por me providenciar as condições necessárias para desenvolver este projeto.

A todo o grupo do laboratório de Diagnóstico Biomolecular do ITQB, pela boa disposição e espírito de entreajuda. Em particular, um agradecimento gigante à Sara Ventura que desde o primeiro dia me recebeu da melhor forma e me transmitiu todos os conhecimentos que precisei para desenvolver este projeto e para me movimentar no laboratório de forma autónoma. Agradeço pela paciência, dedicação, conselhos valiosos, pela forma como me conseguiu motivar a dar sempre o meu melhor e por me ajudar a encontrar soluções para as adversidades que iam surgindo. Foi um prazer aprender e trabalhar contigo.

Aos meus pais, Nuno e Cidália, por me terem dado liberdade para traçar o meu caminho, incentivando-me a lutar pelos meus objetivos e a não desistir. Por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, por serem o meu melhor exemplo, por vibrarem com as minhas conquistas e por respeitarem os meus silêncios. Sou muito grata por vos ter como pais. Espero um dia poder retribuir de alguma forma tudo o que fizeram e fazem por mim e só posso esperar que o meu trajeto pessoal e académico até aqui vos deixe orgulhosos.

À minha irmã Matilde, pela amizade e cumplicidade, pela disponibilidade para ouvir os meus desabafos e inseguranças, pelo conforto do seu abraço, por acreditar mais em mim do que eu própria e pela forma como me conseguiu sempre animar com o seu jeito único, tornando esta jornada mais leve.

Ao meu namorado João, por me apoiar incondicionalmente sem julgamento, por me dar sempre a sua opinião sincera, por me ensinar a descomplicar, por diariamente me incentivar a ser a melhor versão de mim. Pela enorme paciência e confiança, por ser um equilíbrio na minha vida e, essencialmente, por me mostrar que sou capaz de fazer tudo o que quiser se acreditar e trabalhar para isso. É um privilégio partilhar a minha vida contigo.

Aos meus amigos incríveis, Beatriz, Ricardo e Sofia, que estão sempre presentes e me alegram em todos os momentos, pelos longos anos de amizade, por todos os conselhos, por serem honestos nas suas opiniões, por todos os momentos de diversão tão necessários para libertar a mente e por serem a família que eu escolhi.

Aos amigos que a FCUL me deu, Catarina, Miguel, Rafaela e Renato, por estarem comigo desde o primeiro dia, por todos os momentos de partilha de receios e de alegrias, por me ajudarem a levar a vida com mais descontração, por nunca deixarem que eu desistisse e por continuarem a estar presentes na minha vida ainda que já não estejamos juntos todos os dias.

Resumo

A principal função da pele relaciona-se com o revestimento externo do corpo, protegendo-o contra a ação de patógenos e agressões mecânicas e químicas. Anatomicamente, é composta por duas camadas principais, a derme e a epiderme. Os queratinócitos são o tipo celular predominante na epiderme e estão organizados em diferentes camadas, estando constantemente sujeitos à ação de estímulos ambientais. Atualmente, sabe-se que as funções dos queratinócitos vão para além do seu caráter estrutural, sendo células imunologicamente ativas que funcionam como sentinelas capazes de reconhecer moléculas e de produzir mediadores inflamatórios, dos quais se destacam as citocinas. Em condições homeostáticas, os níveis de expressão destes mediadores pelos queratinócitos são bastante reduzidos. Contudo, na presença de vários estímulos, como é o caso da exposição à radiação ultravioleta (UV) ou a fatores tumorais, os queratinócitos tornam-se células ativadas que produzem e libertam vários tipos de citocinas. Consequentemente, tornam-se mais proliferativos e adquirem um fenótipo migratório, caracterizado por alterações na composição do citoesqueleto, começando a expressar queratinas que não são expressas normalmente (ex. queratina 6 (K6) e queratina 17 (K17)). Devido à crescente pressão ética e legal sobre a utilização de animais para fins académicos ou industriais, os modelos tridimensionais (3D) *in vitro* têm-se tornado ferramentas imprescindíveis. Comparativamente aos modelos bidimensionais (2D), os modelos 3D permitem recapitular melhor a fisiologia da pele nativa, possibilitando a interação celular e a comunicação com a matriz extracelular. Neste projeto, o principal objetivo consistiu no desenvolvimento de um modelo tridimensional epidérmico que simulasse uma resposta inflamatória por parte dos queratinócitos. Foram utilizados queratinócitos epidérmicos humanos neonatais (HEKn) e queratinócitos da linha celular N/TERT-1, os quais foram semeados em matrizes comerciais porosas de policarbonato. Para induzir a resposta inflamatória explorou-se a ação de diferentes intensidades de radiação UV-B, ao fim de 48 e 96 horas, e também de diferentes concentrações do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), após 24 e 48 horas. Na ausência de estímulos inflamatórios, foi possível obter modelos com HEKn com organização estrutural semelhante à verificada *in vivo*, tendo esta sido confirmada através da expressão de marcadores epidérmicos. Os ensaios com radiação UV-B parecem indicar que os HEKn efetivamente adotam um fenótipo ativado, no qual existe um aumento da proliferação celular e da expressão da K6 e da K17, bem como da libertação de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-1 β), 48 horas após a exposição. Ao fim de 96 horas os HEKn parecem permanecer num estado ativado, já que foi possível identificar aumentos nos níveis de citocinas relativamente à situação controlo. O TNF- α parece ter provocado um aumento na expressão da K6 e da K17, tendo este aumento sido verificado para ambos os tempos de pós-exposição. Por outro lado, a linha celular N/TERT-1 não se mostrou tão predisponível para recriar a arquitetura multicamada da epiderme nativa, não tendo sido observados sinais de proliferação, diferenciação ou estratificação celular. A espessura dos cortes histológicos, a estabilidade da solução de vitamina C e o tempo de exposição à interface ar-líquido (*air-liquid interface*, ALI) foram estudados como possíveis fatores que influenciasses estes resultados, não se tendo verificado uma relação de causalidade. Uma vez otimizados, os modelos poderão ser utilizados em testes de avaliação de fármacos de ação anti-inflamatória, permitindo prever de forma mais aproximada à realidade o comportamento dos mesmos na pele humana nativa.

Palavras-chave: Queratinócitos; Modelo 3D epidérmico; Radiação UV-B; TNF- α ; Citocinas

Abstract

The main function of the skin is related to the external covering of the body, protecting it against the action of pathogens and mechanical and chemical aggressions. Anatomically, it is composed of two main layers, the dermis and the epidermis. Keratinocytes are the predominant cell type in the epidermis and are organized in different layers, being constantly subject to the action of environmental stimuli. Currently, it is known that the functions of keratinocytes go beyond their structural character, being immunologically active cells that function as sentinels capable of recognizing molecules and producing inflammatory mediators, of which cytokines stand out. Under homeostatic conditions, the expression levels of these mediators by keratinocytes are greatly reduced. However, in the presence of various stimuli, such as ultraviolet radiation (UV) or tumour factors, keratinocytes become activated cells that produce and release various types of cytokines. Consequently, they become more proliferative and acquire a migratory phenotype, characterized by changes in the composition of the cytoskeleton, starting to express keratins that are not normally expressed (e.g., keratin 6 (K6) and keratin 17 (K17)). Due to increasing ethical and legal pressure on the use of animals for academic or industrial purposes, three-dimensional (3D) *in vitro* models have become essential tools. Compared to two-dimensional models (2D), 3D models allow a better recapitulation of the physiology of the native skin, enabling cellular interaction and communication with the extracellular matrix. In this project, the main goal was to develop a 3D epidermal model that simulates an inflammatory response by keratinocytes. For this purpose, neonatal human epidermal keratinocytes (HEKn) and keratinocytes from the N/TERT-1 cell line were seeded in commercial porous polycarbonate matrices. To induce the inflammatory response, we analyse the action of different intensities of UV-B radiation, 48 and 96 hours post irradiation, and of different concentrations of tumour necrosis factor alpha (TNF- α), 24 and 48 hours after treatment. In the absence of inflammatory stimuli, it was possible to obtain HEKn models with structural organization like that observed *in vivo*, which was confirmed through the expression of epidermal markers. Assays with UV-B radiation seem to indicate that HEKn adopt an activated phenotype, in which there was an increase in cell proliferation and expression of K6 and K17, as well as the release of inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 β), 48 hours after exposure. After 96 hours, HEKn appears to remain in an activated state, as it was possible to identify increases in cytokine levels, in comparison to the control situation. TNF- α seemed to have caused an increase in the expression of K6 and K17, and this increase was observed for both post-exposure times. On the other hand, the N/TERT-1 cell line was not able to recreate the multilayer architecture of the native epidermis, and no signs of cell proliferation, differentiation or stratification were observed. The thickness of the histological sections, the stability of the vitamin C solution and the time of exposure to the air-liquid interface (ALI) were studied as possible factors that contributed to these results. However, no causal relationship was found. Once the models are optimized, they can be used in assays to evaluate drugs with anti-inflammatory action, allowing predicting more closely to reality their behaviour in native human skin.

Keywords: Keratinocytes; 3D epidermal model; UV-B radiation; TNF- α ; Cytokines

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract	VI
Lista de figuras	X
Lista de tabelas.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XII
1. Introdução	1
1.1. A pele é um órgão multifuncional	1
1.2. Estrutura tridimensional da pele.....	1
1.2.1. Filamentos intermédios: componentes essenciais da epiderme	3
1.3. A superexposição à radiação UV provoca danos celulares	5
1.4. A inflamação está subjacente a vários processos fisiológicos e patológicos.....	7
1.4.1. A epiderme possui sentinelas imunitárias.....	8
1.4.2. Os queratinócitos produzem e reconhecem mediadores inflamatórios.....	8
1.5. Bioengenharia de tecidos: alternativa para o estudo da fisiologia e patologias cutâneas.....	10
2. Objetivos	13
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1. Manutenção das culturas celulares	14
3.2. Construção de modelos de epiderme 3D com HEK _n	15
3.3. Construção de modelos de epiderme 3D com a linha celular N/TERT-1	15
3.4. Desenvolvimento de modelos 3D de epiderme inflamada	16
3.5. Análise histológica e imunohistoquímica.....	17
3.6. Imunofluorescência	18
3.7. ELISA.....	19
3.8. Análise de dados e microscopia.....	20
4. Resultados	22
4.1. Modelo 3D epidérmico com HEK _n	22
4.1.1. Efeitos da radiação UV-B no modelo 3D epidérmico com HEK _n , 48 horas após a exposição	22
4.1.2. Efeitos da radiação UV-B no modelo 3D epidérmico com HEK _n , 96 horas após a exposição	28
4.1.3. Efeitos do TNF- α em modelos 3D epidérmicos com HEK _n , 24 horas após a sua aplicação	31
4.1.4. Efeitos do TNF- α em modelos 3D epidérmicos com HEK _n , 48 horas após	34

a sua aplicação	34
4.2. Modelo 3D epidérmico com queratinócitos da linha celular N/TERT-1.....	36
4.2.1. Efeitos da radiação UV-B, 48 horas após a exposição	36
4.2.2. Efeitos do TNF- α , 48 horas após a exposição	37
4.2.3. Potenciais fatores que afetam o desenvolvimento e fisiologia dos modelos 3D epidérmicos <i>in vitro</i>	37
5. Discussão.....	39
6. Conclusão.....	46
7. Referências Bibliográficas	48

Lista de figuras

Figura 1. 1 Representação da morfologia da pele humana.....	3
Figura 1. 2 Processo de formação dos IFs.....	4
Figura 1. 3 Importância dos IFs para a manutenção da integridade do tecido epidérmico.	5
Figura 1. 4 Espectro da radiação solar e interação da radiação UV com a pele.	6
Figura 1. 5 O papel dos queratinócitos como sensores de perigo.	9
Figura 3. 1 Representação esquemática do protocolo seguido para o desenvolvimento de epidermes 3D usando HEK _n	16
Figura 3. 2 Representação esquemática do protocolo seguido para o desenvolvimento de epidermes 3D usando a linha celular N/TERT-1.....	16
Figura 3. 3 Representação esquemática do protocolo seguido para a realização de um ELISA <i>sandwich</i>	20
Figura 4. 1 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK _n , sem exposição à radiação UV-B.	23
Figura 4. 2 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK _n , 48 horas após a exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm ² de radiação UV-B.....	24
Figura 4. 3 Atividade proliferativa dos modelos epidérmicos 3D com HEK _n 48 horas após exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm ² de radiação UV-B.....	25
Figura 4. 4 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK _n , 48 horas após a exposição a 40, 50 e 60 mJ/cm ² de radiação UV-B.	26
Figura 4. 5 Espessura média das epidermes 3D com HEK _n , 48 horas após a exposição a diferentes intensidades de radiação UV-B.	27
Figura 4. 6 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com HEK _n , por análise histológica, 48 horas após a exposição a 75 e 90 mJ/cm ² de radiação UV-B.	27
Figura 4. 7 Níveis de citocinas secretadas pelos HEK _n , 48 horas após a exposição a diferentes intensidades de radiação UV-B.	28
Figura 4. 8 Espessura média das epidermes 3D com HEK _n , 96 horas após a exposição a diferentes intensidades de radiação UV-B.	29
Figura 4. 9 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK _n , 96 horas após a exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm ² de radiação UV-B.....	30
Figura 4. 10 Níveis de citocinas secretadas pelos HEK _n , 96 horas após a exposição à radiação UV-B (0, 10, 20, 30 mJ/cm ²).....	31
Figura 4. 11 Espessura média das epidermes 3D com HEK _n , 24 horas após a exposição a diferentes concentrações de TNF- α	31
Figura 4. 12 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK _n , 24 horas após o tratamento com 25, 50 e 100 ng/mL de TNF- α	33
Figura 4. 13 Proliferação celular dos modelos epidérmicos 3D com HEK _n 24 horas após a estimulação com TNF- α	34
Figura 4. 14 Níveis de citocinas secretadas pelos HEK _n , 24 horas após a aplicação de concentrações crescentes de TNF- α (0, 25, 50 e 100 ng/ml).	34
Figura 4. 15 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK _n , 48 horas após o tratamento com 25, 50 e 100 ng/mL de TNF- α	35
Figura 4. 16 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com HEK _n , por análise histológica, 48 horas após o tratamento com 100 e 200 ng/ml de TNF- α	36
Figura 4. 17 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com N/TERT-1, por análise histológica, 48 horas após a exposição a 0, 40, 50 e 60 mJ/cm ² de radiação UV-B.....	36

Figura 4. 18 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com N/TERT-1, por análise histológica, 48 horas após tratamento com 0, 75, 100 e 120 ng/mL de TNF- α	37
Figura 4. 19 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com N/TERT-1, por análise histológica, para estudo da influência da vitamina C (A) e do tempo de exposição à ALI (B).....	38

Lista de tabelas

Tabela 3. 1 Diferentes intensidades de radiação UV-B (em miliJoules por centímetro quadrado (mJ/cm ²)) e respetivos tempos de exposição (em segundos (s)) aplicados nas epidermes 3D.....	18
--	-----------

Lista de abreviaturas

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ALI	<i>Air- liquid interface</i>
AMPs	Péptidos antimicrobianos
ASC	<i>Apoptosis- associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
BPE	Extrato pituitário bovino
cDNA	DNA complementar
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FBS	Soro fetal bovino
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
g	Força centrífuga relativa, força g
H&E	Hematoxilina-Eosina
HEKn	Queratinócitos epidérmicos humanos neonatais
HKGS	Suplemento de crescimento de queratinócitos humanos
HRP	Peroxidase de rábano
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana
IFs	Filamentos intermédios
IGC	Instituto Gulbenkian de Ciência
IL	Interleucina
INV	Involucrina
IPOFG	Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil
ITQB	Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier
K1	Queratina 1
K10	Queratina 10
K14	Queratina 14
K16	Queratina 16
K17	Queratina 17
K6	Queratina 6
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
K-SFM	Meio de queratinócitos sem sêrum
MB	Membrana Basal
mJ/cm²	MiliJoules por centímetro quadrado
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	Fator nuclear - κB

NLRP	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing</i>
NLRs	Recetores tipo NOD
<i>p</i>	<i>p-value</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patogénios
PBS	Tampão fosfato salino
PenStrep	Penicilina/Estreptomicina
PRR	Recetores de reconhecimento de padrão
RHE	Epiderme humana reconstruída
RHS	Pele humana reconstruída
ROS	Espécies reativas de oxigénio
TLRs	Recetores tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
ULF	<i>Unit-length filament</i>
UV	Ultravioleta

1. Introdução

1.1. A pele é um órgão multifuncional

A pele desempenha várias funções fundamentais à sobrevivência dos organismos, desde logo por representar a principal interface entre o ambiente externo e o meio fisiológico do interior do corpo, atuando como primeira linha de defesa¹. A barreira oferecida pela pele confere suporte e elasticidade, assegurando a proteção dos órgãos internos e, simultaneamente, a liberdade de movimentos². Adicionalmente, o sistema tegumentar impede a perda excessiva de água e eletrólitos, prevenindo a desidratação, enquanto limita a absorção desmedida a partir do meio ambiente²⁻⁴. A pele assegura também a termorregulação, devido à existência de termoreceptores e de glândulas sudoríparas, que participam ainda na eliminação de produtos secundários do metabolismo⁴. Dispersos pelo tecido cutâneo existem ainda outros receptores sensoriais que permitem perceber sensações como a dor, toque, vibração ou pressão, possibilitando o estabelecimento de uma relação mais complexa entre os organismos e o meio envolvente³.

O tegumento cutâneo é também um órgão imunocompetente que desempenha funções essenciais para a defesa dos organismos face a agressões externas. A presença de células imunitárias, péptidos antimicrobianos (AMPs) e a produção de ácidos gordos (sebo) pelas glândulas sebáceas, os quais participam na impermeabilização do epitélio, contribuem para a formação de uma barreira imunológica extremamente eficaz^{3,5}. A natureza ácida (pH 4.1-5.9) deste epitélio contribui também para a ação antimicrobiana, sendo letal para potenciais patogénios que prosperam em ambientes alcalinos, mas simultaneamente inofensivo para a microflora nativa, que está adaptada ao microambiente ácido deste órgão⁶. A pele pode também ser considerada como um órgão endócrino independente já que é responsável pela grande maioria (80-90%) da síntese de vitamina D. Além disto, participa na biossíntese de diversas substâncias, como lípidos, carboidratos, colagénio, melanina e proteínas estruturais, tendo também relevância na biotransformação de xenobióticos⁴.

1.2. Estrutura tridimensional da pele

A pele representa o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 16-18% do peso corporal de um adulto e ocupando uma área superficial de cerca de 2m² ^{1,5}. Anatomicamente, é constituída pela justaposição e integração de um epitélio estratificado, ao qual se chama epiderme, com tecido conjuntivo denso, comumente designado por derme. A epiderme e a derme estão separadas pela membrana basal (MB), e assentam sobre a hipoderme, que representa uma camada de tecido adiposo responsável por estabelecer a ligação da pele com os órgãos subjacentes⁵ (Figura 1.1).

Primeiramente descrita por Malpighi, a epiderme consiste num epitélio estratificado pavimentoso, queratinizado, avascular e sem enervação, que deriva da ectoderme e constitui a camada mais externa da pele. A sua espessura varia entre 0.05 mm até 1.5 mm, sendo que nas zonas do corpo protegidas por pelos apresenta menor espessura, ao passo que nas regiões sem pelos, esta camada é mais espessa. Os queratinócitos são o tipo celular predominante na epiderme, correspondendo a cerca de 95% das células existentes, encontrando-se também células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel. Sendo a epiderme a camada mais externa da pele, os queratinócitos estão constantemente sujeitos à ação de diversos fatores ambientais e, conseqüentemente, são mais suscetíveis a sofrer danos. Por essa razão, este epitélio é dinâmico, na medida em que existe renovação celular, estando os queratinócitos constantemente a ser sintetizados no *stratum basale*, e eliminados no *stratum corneum*. Em condições normais, este processo demora cerca de 15 a 30 dias^{5,7}.

O *stratum basale* corresponde à camada epidérmica mais próxima da derme, sendo caracterizado pela presença de uma única camada de células cuboidais ou colunares com núcleos ovoides de dimensões elevadas. Neste estrato as células são heterogéneas, isto é, algumas permanecem conectadas à MB e as restantes funcionam como células estaminais, apresentando elevada atividade mitótica que lhes permite dividir-se e proliferar rapidamente^{4,7} (Figura 1.1.). É também no *stratum basale* que existem melanócitos, células fusiformes de dimensões inferiores às dos queratinócitos que produzem melanina, um pigmento essencial na fotoproteção da pele contra a radiação UV⁷.

Imediatamente adjacente ao *stratum basale* encontra-se o *stratum spinosum*, composto por oito a dez camadas de células, e caracterizado pela elevada presença de desmossomas que conferem um aspeto poliédrico às células, após fixação histológica^{4,7} (Figura 1.1.). Os desmossomas atuam como mecanismos de junção celular e são importantes para manter a integridade do tecido epidérmico, conferindo coesão e resistência face à abrasão a que a pele está sujeita⁵.

A camada seguinte corresponde ao *stratum granulosum*, o qual é composto por três a cinco camadas de células com morfologia achatada e que no citoplasma apresentam elevadas quantidades de filamentos intermédios de queratina (tonofilamentos), que consistem no principal componente proteico da epiderme⁴ (Figura 1.1.). Os queratinócitos desta camada produzem também elevadas quantidades de grânulos de queratohialina, que contêm profilagrina, forma precursora da proteína filagrina, a qual é essencial para o processo de agregação dos tonofilamentos em fibrilhas, sendo estes responsáveis pela integridade da epiderme⁸. Estes grânulos possuem ainda loricrina, um polipéptido cujas funções se refletem ao nível da queratinização do epitélio. Adicionalmente, no citoplasma dos queratinócitos é ainda possível encontrar corpos lamelares, que possuem uma mistura de glicoesfingolípidos, fosfolípidos e ceramidas^{4,5}. À medida que os queratinócitos migram em direção à superfície da epiderme, verifica-se um aumento substancial da quantidade e tamanho dos corpos lamelares no citoplasma, até que eventualmente a sua membrana se funde com a membrana plasmática da célula e o conteúdo lipídico é libertado para o espaço intercelular. Assim, os queratinócitos começam a preparar-se para o processo de cornificação, altura em que as atividades metabólicas vitais da célula cessam e esta degenera. Deste modo, o *stratum granulosum* marca a transição entre os estratos mais internos da epiderme, que se encontram metabolicamente ativos, e os estratos superficiais onde ocorre morte celular^{5,7}.

Em algumas regiões anatómicas específicas desprovidas de folículos pilosos, como as superfícies palmares e plantares, existe uma camada epidérmica adicional, chamada *stratum lucidum*, que consiste numa camada semi-translúcida e homogénea entre o *stratum granulosum* e o *stratum corneum*. É constituída por quatro a seis camadas de queratinócitos completamente achatados, cujo núcleo e organelos citoplasmáticos sofreram digestão enzimática, e cuja membrana plasmática é mais espessa^{4,5} (Figura 1.1.).

O *stratum corneum* é a camada epidérmica mais superficial, composta por 25 a 30 camadas de células funcionalmente inativas e achatadas, que passam a denominar-se por corneócitos⁵ (Figura 1.1.). Estas células são desprovidas de núcleo e organelos, são ricas em queratina e encontram-se numa matriz lipídica resultante da libertação do conteúdo dos corpos lamelares. A profilagrina e loricrina dos grânulos de queratohialina, são essenciais para a formação do envelope cornificado dos queratinócitos, que consiste numa estrutura insolúvel espessa que substitui a membrana plasmática e que contribui para a impermeabilização do epitélio⁹. Deste modo, os corneócitos formam conexões muito sólidas e organizadas entre si, que minimizam os espaços intercelulares e originam padrões complexos, assegurando a integridade da barreira física desempenhada pela pele^{4,5}.

A diferenciação terminal dos queratinócitos é dependente da concentração de cálcio, existindo um gradiente ao longo das diferentes camadas da epiderme que atinge o seu máximo no *stratum granulosum*¹⁰.

O cálcio é responsável pela regulação de diversos fenómenos, como a secreção do conteúdo dos corpos lamelares e os processos apoptóticos que convertem os queratinócitos em corneócitos. Além disto, o cálcio é ainda essencial para a expressão de genes de diferenciação dos queratinócitos (queratina 1 (K1) e queratina 10 (K10), involucrina (INV), filagrina e loricina) e para degradação das proteínas corneodesmossomais, quebrando as ligações entre células adjacentes¹¹.

Ao contrário do que se verifica na camada epidérmica, a derme possui enervação, vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas³ (Figura 1.1.). Tem origem mesodérmica e é composta por uma rede densa e irregular de tecido conjuntivo, que confere suporte à epiderme e se estende até à hipoderme⁴. O tecido conjuntivo da derme é essencialmente composto por uma matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas, que conferem estrutura e hidratação a esta camada². Adicionalmente, na derme existem também fibras de colagénio e de elastina que conferem rigidez e elasticidade, respetivamente³. Os fibroblastos são por excelência as células do tecido conjuntivo, apresentando-se como fusiformes e com núcleo bem visível, contribuindo para a produção e regeneração da matriz extracelular².

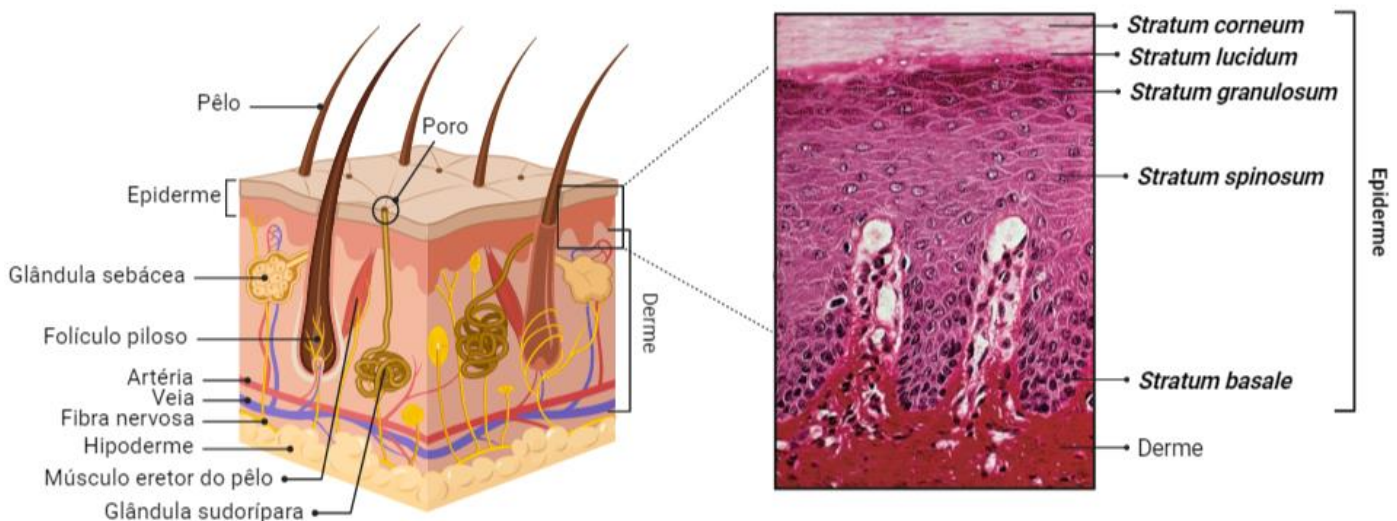


Figura 1.1 Representação da morfologia da pele humana. À esquerda apresenta-se a representação esquemática da estrutura da pele, onde estão retratadas a epiderme, a derme e os diversos apêndices (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas). À direita apresenta-se um corte histológico de pele humana (coloração Hematoxilina-Eosina (H&E)), evidenciando as diferentes camadas da epiderme (*stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* e *stratum corneum*). Adaptado de (5). Ilustração criada em BioRender.com.

1.2.1. Filamentos intermédios: componentes essenciais da epiderme

Juntamente com os filamentos de actina (microfilamentos) e microtúbulos, os filamentos intermédios (IFs) são um dos principais componentes do citoesqueleto das células dos metazoários. Estes polímeros foram inicialmente distinguidos pelas suas dimensões, já que possuem um diâmetro de aproximadamente 10 nm, sendo menores do que os microtúbulos (25 nm) mas maiores do que os microfilamentos (7 nm)¹². Enquanto os microfilamentos e os microtúbulos são polímeros compostos por apenas um tipo de proteínas (actina e tubulina, respetivamente), os IFs são compostos por um ou mais membros de uma grande família de proteínas, codificadas por mais de 70 genes¹³, e cuja expressão é influenciada pelo tipo celular¹⁴. Atualmente, conhecem-se mais de 50 tipos de proteínas de IFs que se encontram classificadas em seis tipos, de I a VI, com base na sua composição em aminoácidos e na homologia da sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA)¹².

Outra característica única dos IFs relaciona-se com o seu modo de agregação. Os microfilamentos e microtúbulos agregam-se de forma polar, isto é, enquanto na extremidade apical há polimerização, através da adição de monómeros, na extremidade oposta ocorre despolimerização. Contrariamente, os IFs são estruturas apolares, podendo crescer em ambas as direções. A formação dos IFs inicia-se com o alinhamento paralelo de dois monómeros, formando dímeros. Os dímeros associam-se lateralmente de forma antiparalela formando tetrâmeros apolares que, por sua vez, se associam lateralmente formando a *unit-length filament* (ULF). O crescimento dos IFs dá-se então pela agregação longitudinal de ULFs que, posteriormente, são sujeitas a uma compactação radial que reduz o seu diâmetro para 10 nm¹⁴ (Figura 1.2).

Os subtipos I e II são compostos por queratinas, correspondendo a 54 dos 70 genes codificantes de IFs, o que as torna nos IFs mais abundantes em todos os epitélios¹³. As queratinas expressas nos humanos são categorizadas, com base nas suas propriedades eletroquímicas, em queratinas ácidas (tipo I) ou neutras/básicas (tipo II). Estes dois subtipos são também divergentes no que respeita ao seu peso molecular (40-56.5 kDa para as queratinas tipo I e 53-67 kDa para as queratinas tipo II)¹⁵. Para a agregação dos tonofilamentos é necessário que um polipéptido do tipo I se agregue com um polipéptido do tipo II, formando heterodímeros^{12,15} (Figura 1.2).

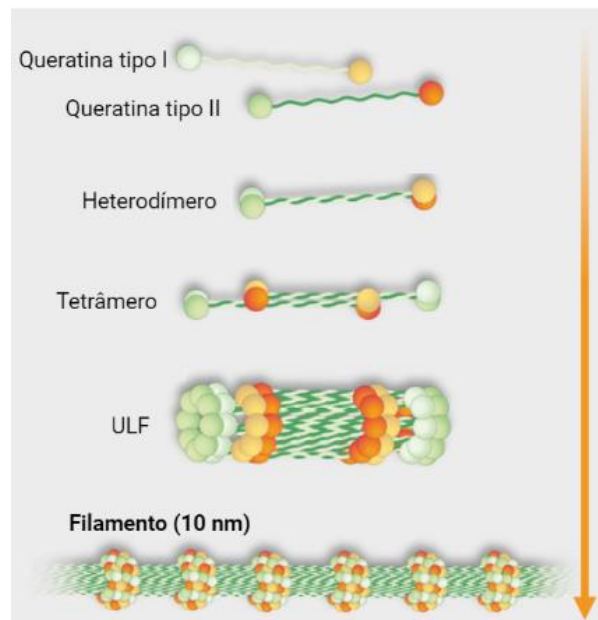


Figura 1. 2 Processo de formação dos IFs. A formação dos IFs começa com a associação paralela de dois monómeros, formando heterodímeros. No caso das queratinas, a formação dos dímeros ocorre através da interação de um monómero de queratina tipo I com um monómero tipo II. Os heterodímeros associam-se de forma antiparalela originando tetrâmeros que, posteriormente, se associam lateralmente formando a *unit-length filament* (ULF). As ULFs agregam-se longitudinalmente e, após sofrerem compactação, originam filamentos de queratina com 10 nm de diâmetro. A seta à direita indica o sentido em que a formação dos IFs se desenrola. Adaptado de (16).

Comparativamente com os microfilamentos e os microtúbulos, os IFs apresentam maior estabilidade e flexibilidade, sendo fundamentais ao conferirem suporte mecânico e assegurarem a integridade estrutural das células, permitindo as ligações entre si e com a matriz extracelular^{12,14}. No caso específico dos epitélios estratificados como a epiderme, as ligações entre células adjacentes realizam-se através de desmossomas por interação dos tonofilamentos com a desmoplaquina. Por outro lado, os IFs estão também envolvidos nas interações das células com a matriz extracelular, sendo esta ligação reforçada em órgãos sujeitos a stresses mecânicos, como é o caso da pele. Assim, as ligações dos queratinócitos do *stratum basale* à MB ocorrem através de hemidesmossomas, por intermédio da plectina¹⁴ (Figura 1.3).

A regulação da expressão das queratinas é dependente de vários fatores, entre os quais, o tipo de tecido, o estágio de diferenciação da célula e o contexto em que a célula se encontra, evidenciando assim a relevância destas proteínas como biomarcadores¹⁵. No caso específico da epiderme, perante condições de homeostase, o processo de diferenciação caracteriza-se pela expressão diferencial de queratinas nas várias camadas, verificando-se elevados níveis de expressão da queratina 5 (K5) e da queratina 14 (K14) no *stratum basale*. Porém, à medida que os queratinócitos se diferenciam e migram para as camadas superiores a expressão destas queratinas diminui, verificando-se um aumento na expressão da K1 e da K10. Perante certos estímulos, como tensão mecânica ou *stress* químico (ex. hipoxia) os padrões de expressão das queratinas são alterados. Em resposta a infeções ou condições inflamatórias associadas a certas patologias, verifica-se um aumento na expressão das queratinas 6 (K6), 16 (K16) e 17 (K17). O aumento da expressão destas queratinas está associado ao decréscimo da expressão de queratinas expressas em condições de equilíbrio, como a K1 e K10, indicando que as células se encontram num estado ativado e hiperproliferativo^{15,17}. Além disto, a expressão destas queratinas pode também ser induzida por várias citocinas e fatores de crescimento, como o TNF- α , ou pela ação da radiação UV¹⁵.

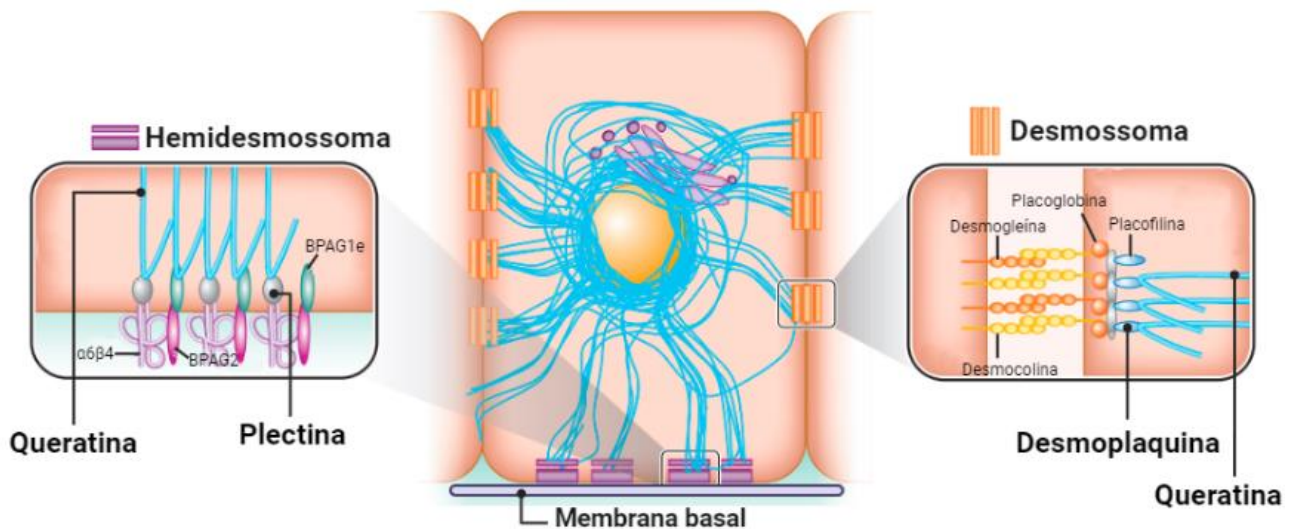


Figura 1. 3 Importância dos IFs para a manutenção da integridade do tecido epidérmico. Os tonofilamentos asseguram a ligação entre células adjacentes através da desmoplaquina nos desmossomas (na imagem à direita) e, simultaneamente, são também fundamentais para as interações das células com a MB, através de hemidesmossomas, mediante interação com a plectina (na imagem à esquerda). Adaptado de (14).

1.3. A superexposição à radiação UV provoca danos celulares

Estando a pele em contacto direto com o meio exterior, nenhum outro órgão está tão exposto e, consequentemente, vulnerável aos efeitos dos stresses ambientais, sendo estes muitas vezes manifestados sob a forma de lesões que provocam feridas, doenças inflamatórias e oncológicas ou que aceleram o envelhecimento¹⁸. Os seres humanos encontram-se constantemente expostos à ação da radiação solar, quer seja de forma natural ou artificial, estando os efeitos dessa exposição bem documentados. Quando em doses adequadas, a radiação solar tem implicações importantes para a saúde (ex. síntese de vitamina D), contudo, a superexposição, pode potenciar o aparecimento de diversas condições clínicas¹⁹.

Cerca de 51% das ondas eletromagnéticas produzidas pelo sol encontram-se na região correspondente à radiação infravermelha, sendo que do restante, 47% corresponde à luz visível e 2% à radiação UV²⁰. Por sua vez, o espectro da radiação UV encontra-se dividido, consoante o comprimento de onda da radiação, em UV-C (100-290nm), UV-B (290-320nm) e UV-A (320-400nm), sendo o comprimento de onda inversamente proporcional ao potencial energético das radiações¹⁹. Deste modo, as radiações UV-C são as mais energéticas e, consequentemente, as que têm maior potencial para causar danos biológicos.

Contudo, a atmosfera atua como um filtro que absorve cerca de 77% da radiação UV total, impedindo que os raios UV-C alcancem a superfície terrestre. Adicionalmente, mais de 90% da radiação UV-B é retida na atmosfera, sendo a radiação UV que alcança a superfície da Terra composta por raios UV-A (95%) e, em muito menor quantidade, por raios UV-B (5%)²¹. No que respeita à interação da radiação UV com a pele, sabe-se que a capacidade de penetração no tecido cutâneo é diretamente proporcional ao comprimento de onda das radiações. Assim, apesar de menos energéticas, as radiações UV-A têm maior capacidade de penetração, atingindo a camada dérmica, ao passo que as radiações UV-B afetam maioritariamente a epiderme^{20,22} (Figura 1.4).

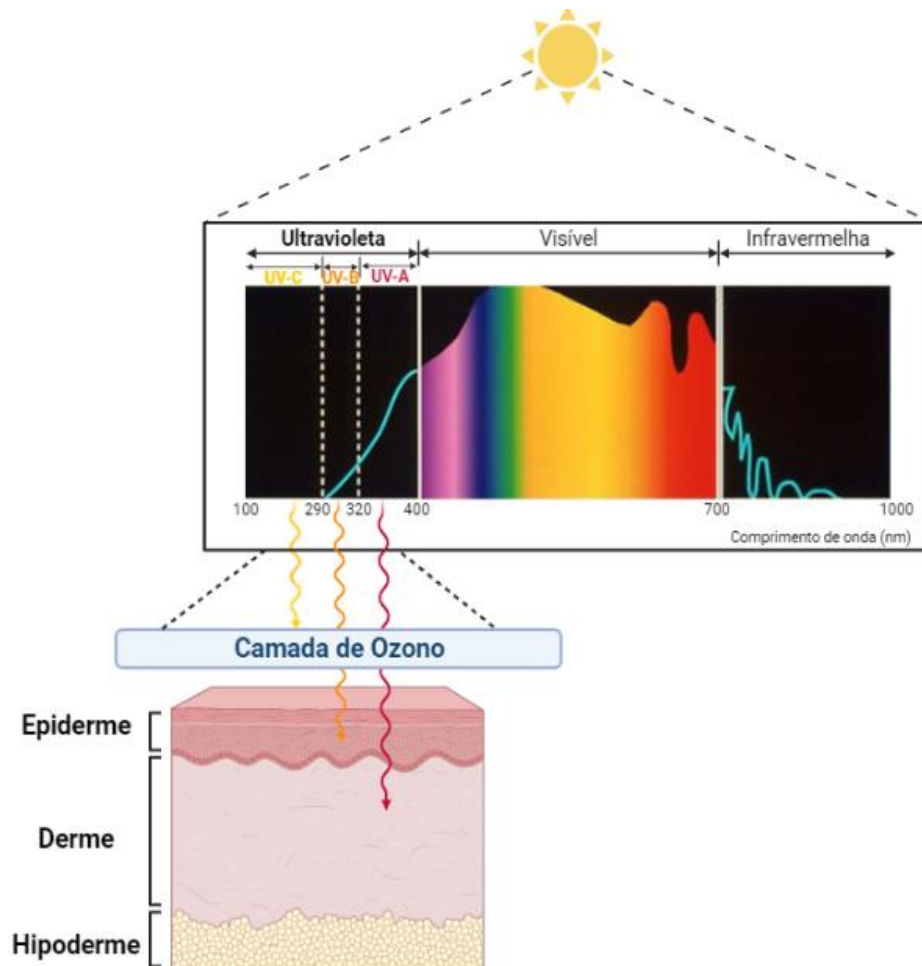


Figura 1. 4 Espectro da radiação solar e interação da radiação UV com a pele. O espectro da radiação solar inclui as radiações UV, a luz visível e as radiações infravermelhas. O espectro da radiação UV está dividido em radiações UV-C (100-290nm), UV-B (290-320nm) e UV-A (320-400nm), sendo o comprimento de onda inversamente proporcional ao potencial energético. As radiações UV-C ficam retidas na camada de ozono da atmosfera, ao passo que as radiações UV-B e UV-A atingem a superfície terrestre. As radiações UV-A exibem maior capacidade de penetração no tecido cutâneo, atingindo a camada dérmica, enquanto as radiações UV-B atingem sobretudo a epiderme. Adaptado de (23). Ilustração criada em BioRender.com.

A radiação UV é responsável por provocar uma grande variedade de efeitos na pele, que podem ser agudos ou crónicos. As respostas agudas incluem fotolesões, eritemas, mutações, imunossupressão e síntese de vitamina D. Por outro lado, os efeitos crónicos mais preponderantes são o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogénese. As radiações UV-A e UV-B apresentam diferentes propriedades no que respeita aos efeitos biológicos que despoletam na pele^{19,24}. A radiação UV-B atua diretamente sobre o DNA das células, provocando fotolesões e rearranjos moleculares através da formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs). Caso os mecanismos de reparação celular endógenos não consigam repor a integridade genómica, estabelecem-se mutações que, em muitos casos, persistem ao longo das divisões celulares conduzindo à carcinogénese. Por outro lado, a radiação UV-A não tem efeito direto sobre o

DNA. Ao invés disso, os fotões de radiação UV-A absorvidos conduzem à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que podem transferir a sua energia para o DNA através de intermediários oxidativos²⁴. Quando a concentração de ROS na célula é demasiado elevada, instala-se um desequilíbrio face à quantidade de moléculas antioxidantes, provocando stress oxidativo que, por sua vez, altera as funções celulares¹⁹. Deste modo, os efeitos da radiação UV-A estão sobretudo associados a manifestações fenotípicas que se traduzem no envelhecimento precoce da pele. Em contrapartida, o superior potencial mutagénico e citotóxico da radiação UV-B²⁴ traduz-se no aparecimento de eritemas graves, que se caracterizam por uma resposta inflamatória aguda e que podem evoluir para lesões carcinogénicas¹⁹.

1.4. A inflamação está subjacente a vários processos fisiológicos e patológicos

A inflamação apresenta-se como um mecanismo de defesa inato e vital que surge como resultado de diversos processos evolutivos. A sua finalidade é potenciar o combate contra agentes prejudiciais para a saúde, promovendo a remodelação dos tecidos e, em última instância, o restabelecimento da homeostase²⁵.

As respostas imunitárias inatas baseiam-se no reconhecimento inespecífico, através de recetores de reconhecimento de padrão (PRR), de moléculas genericamente designadas por padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs), que se encontram em muitos tipos diferentes de microrganismos²⁶. Adicionalmente, os PRR reconhecem também moléculas endógenas que são produzidas e libertadas por células danificadas ou mortas, respetivamente, em resposta a danos físicos, químicos ou metabólicos (agentes estéreis) e que se designam por padrões moleculares associados ao dano (DAMPs)^{26,27}. Assim, a inflamação pode ser desencadeada quando existe reconhecimento de patogénios, lesões dos tecidos ou indução de stress celular (inflamação estéril)²⁷.

Perante o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs pelos PRR das células dos tecidos lesados, a resposta inflamatória aguda é iniciada com a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas (ex. interleucina (IL)-1 β e IL-6), quimiocinas, leucotrienos e prostaglandinas²⁷. As citocinas são proteínas reguladoras que se ligam a recetores específicos e que desempenham um papel fundamental na comunicação celular, assegurando a manutenção da homeostase do organismo^{28,29}. A ação mais imediata dos mediadores inflamatórios recai sobre o endotélio vascular que, perante tais estímulos, é ativado, verificando-se um aumento na vasodilatação e permeabilidade vascular, bem como na produção de moléculas de adesão celular (ex. seletinas). Desta forma, através de um processo seletivo, os leucócitos, na sua maioria neutrófilos, que normalmente estão restringidos aos vasos sanguíneos, extravasam para os tecidos lesados. Uma vez nos tecidos, os neutrófilos migram, por quimiotaxia, até ao local onde existe maior expressão de mediadores inflamatórios pelas células residentes, onde libertam o conteúdo tóxico dos seus grânulos, na tentativa de neutralizar a ameaça³⁰.

Quando as ameaças estão controladas é necessário que a reação inflamatória cesse, por forma a impedir a sua progressão e exacerbação que, caso contrário, pode causar graves danos teciduais. A resolução da inflamação é um processo ativo e complexo, regulado tanto a nível espacial como temporal, e dependente da ação controlada de vários intervenientes para o restabelecimento das condições pré-inflamatórias³¹. De forma simplificada, durante esta fase começam a ser produzidos mediadores anti-inflamatórios, como lipoxinas, resolvinas e protetinas, em detrimento dos mediadores pró-inflamatórios até então expressos. Em particular, as lipoxinas desempenham um papel crucial, já que inibem o recrutamento de neutrófilos e, simultaneamente, promovem o recrutamento de monócitos, que vão eliminar as células mortas resultantes da reação inflamatória aguda, promovendo, por fim, a reparação dos tecidos^{30,31}.

1.4.1. A epiderme possui sentinelas imunitárias

Durante muito tempo, o caráter estrutural dos queratinócitos era visto como a sua única função. Contudo, atualmente, sabe-se que estas células não são imunologicamente inertes, sendo consideradas sentinelas ativas, que contribuem para a preservação da barreira imunológica da pele^{32,33}. Além de serem capazes de produzir uma grande variedade de mediadores químicos, como citocinas, estas células têm ainda capacidade para responder a esses mediadores, já que possuem recetores para os mesmos³⁴. Adicionalmente, os queratinócitos são também capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs através vários tipos de PRRs, entre os quais se destacam os recetores tipo *Toll* (TLRs) e os recetores tipo *NOD* (NLRs)^{32,33}.

Os TLRs são recetores transmembranares situados na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) ou em compartimentos intracelulares, como endossomas (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9), e que podem ser ativados por microrganismos ou moléculas endógenas libertadas por células danificadas^{32,33,35}. O reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelos TLRs conduz à ativação das vias de sinalização celular do hospedeiro que despoletam respostas imunitárias inatas e adaptativas, havendo produção de AMPs, citocinas e quimiocinas³⁵ (Figura 1.5).

Os NLRs são recetores intracelulares que detetam a presença de PAMPs e DAMPs, conduzindo à formação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma. Para a formação deste complexo é necessária a presença de uma proteína recetora NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing*), uma proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) e uma protéase pró-caspase 1^{36,37} (Figura 1.5). As interações entre estas proteínas coordenam as funções do inflamassoma que, por sua vez, regula a inflamação e a resposta imunitária inata. São vários os estímulos que podem ativar o inflamassoma NLRP, como é o caso da radiação UV-B, algumas toxinas e produtos irritantes³⁸. A ligação dos componentes do inflamassoma NLRP conduz à ativação da caspase 1 que, por sua vez, induz a maturação da IL-1 β e IL-18 através da clivagem das suas formas precursoras (pró-IL-1 β e pró-IL-18)³⁶ (Figura 1.5). A ativação destas citocinas amplifica a resposta inflamatória através da expressão de outras citocinas, da proliferação dos queratinócitos e da ativação de células imunitárias³³.

1.4.2. Os queratinócitos produzem e reconhecem mediadores inflamatórios

Os queratinócitos apresentam-se como os principais produtores de citocinas da epiderme expressando, simultaneamente, recetores que reconhecem alguns tipos dessas citocinas por eles produzidas. Em condições de homeostase, os níveis de produção constitutiva de mediadores inflamatórios pelos queratinócitos são bastante reduzidos. Contudo, perante vários estímulos, como a radiação UV-B²⁹, microrganismos, fatores tumorais ou qualquer disrupção da barreira física da pele, os queratinócitos deixam de estar inativados, havendo um aumento significativo da produção de citocinas. Perante tal cenário, estas células adotam um fenótipo migratório, proliferativo e pró-inflamatório, caracterizado por alterações na composição do citoesqueleto, através da expressão de queratinas até então não expressas (ex. K6 e K17)^{39,40}.

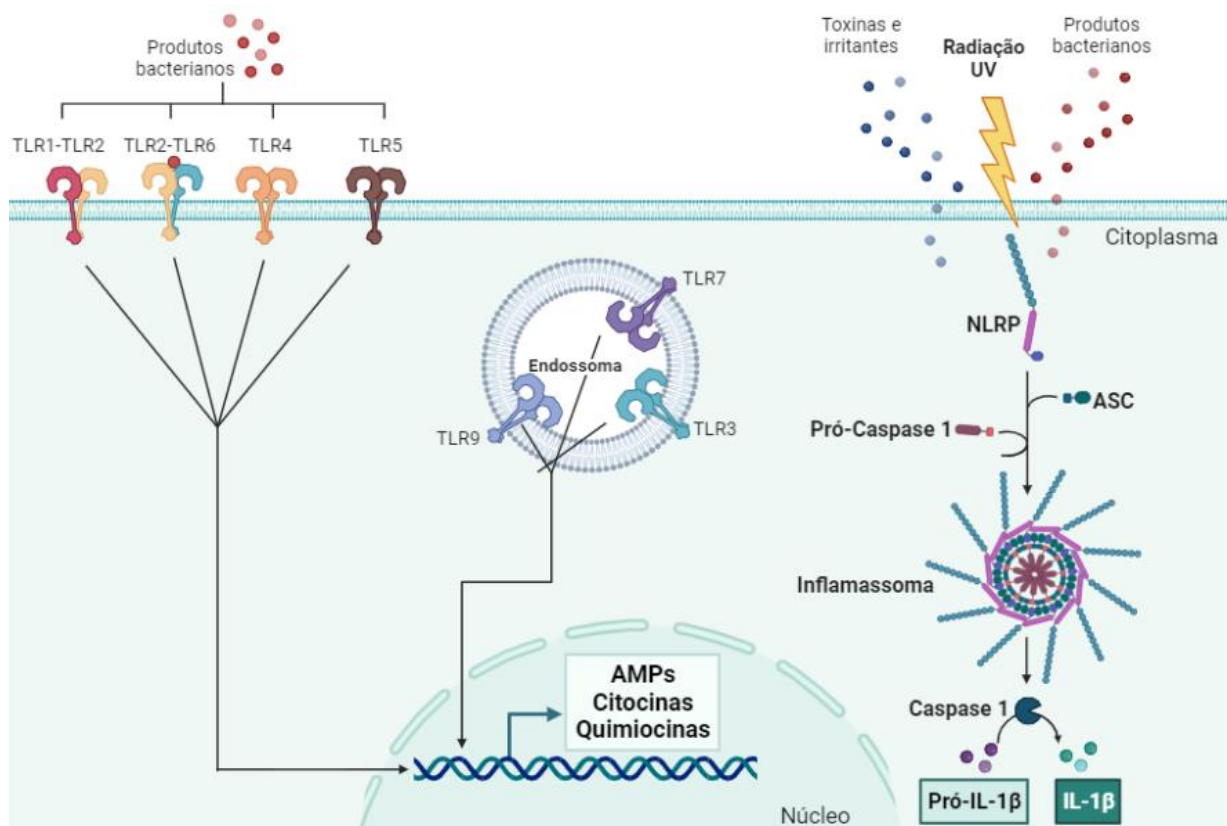


Figura 1. 5 O papel dos queratinócitos como sensores de perigo. Os queratinócitos possuem receptores de reconhecimento de padrão (PRR) dos quais se destacam os receptores tipo *Toll* (TLRs) e os receptores tipo *NOD* (NLRs). Os TLRs são receptores transmembranares que estão presentes na membrana plasmática da célula ou em endossomas e que, quando ativados conduzem à produção de péptidos antimicrobianos (AMPs), citocinas e quimiocinas. A radiação UV, assim como outros fatores, conduzem à ativação dos NLRs citoplasmáticos, resultando na ativação do inflamassoma. Este complexo multiproteico é composto por uma proteína recetora NLRP, uma proteína adaptadora ASC e uma pró-caspase 1. Quando estes componentes se juntam, a caspase 1 é ativada e a pró-interleucina-1 β (pró-IL-1 β) é clivada, adquirindo uma conformação biologicamente ativa (IL-1 β). Adaptado de (41). Ilustração criada em BioRender.com.

Mais do que qualquer outra família de citocinas, os membros da família IL-1 estão intimamente associados com a inflamação aguda e crónica⁴². Em particular, a IL-1 β é uma citocina altamente inflamatória, cuja regulação da sua expressão, entre outros aspetos, foram extensivamente estudados ao longo dos anos^{43,44}. É sintetizada sob a forma de um precursor funcionalmente inativo (pró-IL-1 β) que, após sofrer clivagem pela enzima caspase-1, adquire a conformação necessária para se ligar aos receptores membranares (IL-1R), tornando-se bioativa⁴⁴. Existem dois receptores de membrana aos quais a IL-1 β se pode ligar, sendo o IL-1RI considerado um recetor biologicamente ativo e o IL-1RII funcionalmente inativo³⁹. Em condições homeostáticas a IL-1 β não é expressa de forma constitutiva pelos queratinócitos⁴⁵. Contudo, quando a epiderme é lesada, as reservas citoplasmáticas desta citocina são libertadas, atuando de forma parácrina sobre uma grande variedade de células, como é o caso das células endoteliais, que passam a expressar maiores quantidades de moléculas de adesão, e dos leucócitos, induzindo a sua migração por quimiotaxia para o local afetado^{40,43}. Adicionalmente, a IL-1 β atua também sobre os próprios queratinócitos (ação autócrina), estimulando a sua migração e hiperproliferação, ao mesmo tempo que induz a produção de fatores de crescimento e de outras citocinas (ex. IL-6), contribuindo para a manutenção do estado inflamatório^{39,40}. Grandes aumentos na secreção desta citocina estão na base de patologias inflamatórias como a psoríase e a dermatite atópica⁴⁶.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que provoca múltiplos efeitos e que é expressa pelos queratinócitos humanos, estando maioritariamente associada à resposta inflamatória. Em condições normais, os queratinócitos produzem e libertam quantidades muito reduzidas de IL-6, mas a disrupção da barreira epidérmica através da ação de vários agentes, como é o caso da radiação UV-B, intensifica a expressão desta citocina⁴⁷. O aumento da libertação de IL-6 pelos queratinócitos está associado com um aumento da sua proliferação e com a diferenciação anormal da epiderme, estando a sua ação bem documentada em diversas patologias inflamatórias de pele⁴⁸. Além disto, a IL-6 desempenha também um papel fundamental na promoção da maturação e ativação dos neutrófilos e na maturação de macrófagos, realçando a sua importância como citocina pró-inflamatória⁴⁹.

O TNF- α é também uma citocina com um papel essencial na regulação da resposta inflamatória. Em condições normais, a sua expressão na epiderme está restrita às camadas superiores e ocorre em quantidades controladas, tendo efeitos geralmente benéficos para o hospedeiro. Todavia, sob condições patológicas, a sua libertação é aumentada, podendo conduzir a efeitos deletérios^{28,32}. Além da participação na inflamação cutânea, esta citocina está ainda envolvida numa grande variedade de processos, incluindo a proliferação e diferenciação celular, bem como a indução da apoptose^{50,51}. Estes e outros efeitos são mediados através da ligação desta molécula a um dos seus dois recetores membranares- TNFR1 e TNFR2³². Os queratinócitos apresentam capacidade para produzir e responder a esta citocina através do TNFR1 que, quando ativado, conduz à ativação de vários fatores de transcrição que culminam na expressão de outras citocinas (ex. IL-1 e IL-6), quimiocinas e moléculas de adesão⁵⁰. Adicionalmente, quando combinado com outras citocinas, o TNF- α contribui para a amplificação da resposta imunitária por parte dos queratinócitos⁵¹.

Estes e outros mediadores pró-inflamatórios produzidos pelos queratinócitos ativados podem atuar de forma autócrina, potenciando a resposta inflamatória dos próprios queratinócitos, mas também de forma parácrina, atuando sobre outros tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais e células imunitárias³². Assim, os queratinócitos podem ser descritos como células efectoras pró-inflamatórias que se encontram estrategicamente posicionadas na interface do organismo com o meio exterior, e que reagem a diversos stresses ambientais através da produção coordenada de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores^{32,41}. Desta forma, estas evidências suportam o conceito de a epiderme ser um órgão com atividade imunológica e realçam o papel complexo que os queratinócitos desempenham na inflamação²⁹.

1.5. Bioengenharia de tecidos: alternativa para o estudo da fisiologia e patologias cutâneas

Embora a pele humana seja o modelo ideal para investigar distúrbios dermatológicos e realizar testes de toxicidade, a sua utilização é muito restrita devido a questões éticas e de segurança, sendo a experimentação animal um dos métodos alternativos mais utilizados⁵². Contudo, nos últimos anos o uso de seres vivos para fins académicos, clínicos ou industriais tem sido cada vez mais alvo de debates éticos e sociais⁵³. Como resultado, a União Europeia implementou políticas de proibição de testagem de produtos cosméticos em animais (Regulamento (CE) No. 1223/2009), acompanhadas de várias recomendações (ex. princípio dos 3Rs) (Diretiva 2010/63/UE)⁵⁴⁻⁵⁶. Adicionalmente, o uso de modelos animais, nomeadamente ratinhos, apresenta-se como uma alternativa pouco fiável, já que a sua utilização está associada a uma capacidade preditiva limitada devido às diferenças interespecíficas da fisiologia da pele, bem como, dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão de determinadas patologias⁵⁷. Deste modo, enquanto alguns dos fármacos aprovados pela experimentação animal se podem mostrar tóxicos para os humanos, outros podem ser seguros, apesar de não serem aprovados nos ensaios com animais^{58,59}. Por outro lado, o uso de espécies cuja pele apresenta maior semelhança com a pele humana (ex. suínos) é logisticamente complicado e os custos associados não permitem o seu uso⁶⁰. Assim, devido sobretudo a questões éticas

e económicas, os investigadores têm sido encorajados a reduzir a experimentação animal em detrimento de modelos *in vitro*, que são fundamentais para estudos de citotoxicidade, modulação de patologias e para o aumento do conhecimento da biologia dos tecidos⁵⁶.

Quando comparados com os modelos 3D, os modelos 2D apresentam-se como alternativas mais económicas e fáceis de manipular, permitindo obter resultados mais rapidamente. Porém, são várias as limitações associadas a estes modelos, os quais se baseiam em monoculturas de células que crescem em monocamada, originando representações simplistas da morfologia dos tecidos nativos^{52,59}. Deste modo, os modelos 2D não permitem o estabelecimento de interações celulares nem a comunicação das células com a matriz extracelular, sendo estes fenómenos essenciais para diversos processos (ex. mitose e diferenciação)^{57,61}. Adicionalmente, devido ao crescimento em monocamada, a expressão génica e a estrutura do citoesqueleto das células são também alteradas, resultando na perda de diversidade fenotípica e de diversas funções fisiológicas^{57,62}.

Os modelos 3D compreendem um microambiente específico para o tecido em estudo, permitindo o crescimento e interação celular e assegurando a manutenção da tridimensionalidade das células. Além disto, estes modelos permitem também estudar as interações entre diferentes tipos celulares, bem como a comunicação com a matriz extracelular. Assim, por permitirem uma maior aproximação às condições verificadas *in vivo* e apresentarem um tempo de produção relativamente baixo, os modelos 3D são considerados como uma excelente ferramenta de investigação^{57,61}. No que respeita ao tecido cutâneo, podem ser elaborados modelos de epiderme humana reconstruída (RHE) ou modelos de pele humana reconstruída (RHS)⁵⁹.

Os modelos de RHE obtêm-se através da cultura de queratinócitos sobre uma membrana polimérica (*scaffold*), perante condições propícias à diferenciação e estratificação das células, nomeadamente, através da exposição à ALI, essencial para a obtenção da morfologia aproximada às condições fisiológicas da epiderme^{63,64}. Além do cálcio, são ainda necessários fatores de crescimento e outras moléculas para o sucesso destes modelos. O ácido ascórbico, comumente designado por vitamina C, é particularmente relevante na medida em que promove a diferenciação dos queratinócitos e contribui para o equilíbrio do perfil antioxidante das células, através do aumento dos níveis de glutathione intracelular^{65,66}. Os *scaffolds* utilizados para gerar modelos de RHE e RHS têm como objetivo fornecer suporte e facilitar a adesão e o crescimento 3D das células, mimetizando as propriedades mecânicas e biológicas da matriz extracelular⁶⁷. Desta forma, os *scaffolds* podem ter origem natural ou sintética, sendo os mais utilizados os *scaffolds* de policarbonato ou poliestireno, devido às suas propriedades físicas (porosidade e elasticidade) e por serem inertes e biocompatíveis⁶⁸. O uso de *scaffolds* sintéticos é ainda vantajoso na medida em que a sua utilização não necessita obrigatoriamente de ser conjugada com produtos de origem animal, valorizando os modelos.

A matriz extracelular é composta por uma mistura de proteínas secretadas pelos queratinócitos e fibroblastos. Por essa razão, nos modelos de RHE, a ausência de interação entre as células da epiderme e da derme pode representar uma desvantagem, podendo esta ser ultrapassada através da utilização de polímeros naturais, nomeadamente, colagénio, que facilita a adesão dos queratinócitos ao *scaffold*^{54,68}. Outra opção é a de introduzir um componente dérmico (ex. fibroblastos) nos modelos, tornando-os mais aproximados das condições *in vivo* e, por isso, melhores abordagens para investigar diversas doenças e as ações de produtos químicos na pele⁵⁶.

O tipo de células a utilizar nestes modelos é também um fator importante a ter em consideração. Os modelos de RHE e RHS atualmente existentes são geralmente elaborados com células primárias, obtidas a partir de intervenções cirúrgicas realizadas em indivíduos com pele saudável. Estas células permitem

obter modelos bastante representativos das características morfológicas e funcionais dos tecidos. Todavia, a logística relacionada com a sua obtenção, a variação associada à recolha a partir de diversos dadores e a capacidade restrita de proliferação e expansão destas células são as principais desvantagens associadas ao seu uso⁵⁷. O uso de linhas celulares, como é o caso da linha celular N/TERT-1, pode representar uma solução para as limitações das células primárias. Esta linha celular foi desenvolvida no ano de 2000 a partir da imortalização de queratinócitos com o DNA complementar (cDNA) da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT)⁶⁹, que codifica a subunidade catalítica da telomerase, prevenindo o encurtamento dos telómeros. Contudo, para atingir a imortalização dos queratinócitos é ainda necessário que o mecanismo de controlo pRB/p16^{INK4a} do ciclo celular seja bloqueado, impedindo a senescência das células⁷⁰. Desta forma, as células pertencentes a esta linha celular possuem maior tempo de vida quando comparadas com células primárias, exibindo propriedades fenotípicas e fisiológicas preservadas^{56,70,71}.

Além dos modelos epidérmicos comercialmente disponíveis (ex. EpiDermTM (MatTek, EUA) e Episkin (L'Oréal, SkinEthic, França)), existem também modelos que mimetizam o fenótipo de patologias específicas, como é o caso da psoríase (ex. InflammSkin® (Genoskin, EUA) e *Psoriasis* (MatTek, EUA)). Contudo, estes modelos podem ser dispendiosos e nem sempre são adaptáveis aos objetivos de cada pesquisa, por serem bastante genéricos^{72,73}. Desta forma, o desenvolvimento de modelos de RHE e RHS a partir de protocolos facilmente reproduzíveis e que permitam selecionar as condições ideais para cada estudo, é importante para alargar o espectro de aplicações destes modelos e difundir o seu uso em áreas como a biomedicina e a toxicologia^{55,71}.

2. Objetivos

A cultura celular 3D apresenta-se como uma técnica vital e de valor inestimável para uma vasta quantidade de aplicações biomédicas, tanto no âmbito académico como industrial. A engenharia de tecidos é uma das áreas que mais beneficia da cultura celular 3D, permitindo uma aproximação à estrutura e função de determinados tecidos e órgãos *ex vivo*, o que possibilita a produção de modelos fisiologicamente mais relevantes e, por isso, mais confiáveis para serem utilizados com várias finalidades (ex. regeneração de tecidos, transplantes)⁵⁷. Em particular, a engenharia de tecidos cutâneos mostra-se mais avançada, relativamente a outros órgãos, devido à necessidade de as entidades comerciais testarem compostos químicos antes destes chegarem ao mercado⁵⁴. Contudo, os modelos de epiderme e pele comercialmente disponíveis nem sempre atendem às necessidades específicas de cada estudo.

Tendo isto em mente, o principal objetivo deste projeto consistiu no desenvolvimento e na caracterização de um modelo 3D de epiderme humana que reciasse uma reação inflamatória, *in vitro*. Para tal, foi avaliado o desempenho da radiação UV-B e do TNF- α como indutores dos processos inflamatórios em HEK293 e em queratinócitos da linha celular N/TERT-1, tendo-se estudado os efeitos resultantes ao nível da expressão de biomarcadores epidérmicos e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

3. Materiais e Métodos

3.1. Manutenção das culturas celulares

Todos os procedimentos relativos à cultura e manuseamento de material biológico realizaram-se numa câmara de fluxo laminar classe II, tipo A/B3 (Nuair, Doncaster, Inglaterra), utilizando técnicas assépticas⁷⁴, de modo a evitar qualquer contaminação microbiológica das culturas celulares. Utilizaram-se HEK_n (cat. no. C0015C, Gibco®, Waltham, EUA) e queratinócitos da linha celular N/TERT-1, estabelecida por Dickson *et al.*, 2000, e gentilmente disponibilizada pelo Dr. Van den Bogaard (Universidade de Radboud, Nijmegen, Países Baixos). As culturas 2D de HEK_n estabeleceram-se em frascos de cultura (*T-flasks*) de 75 cm² (734-2313, VWR, Radnor, EUA) com meio *Epilife* (MEPICF, Gibco®, Waltham, EUA) suplementado com 1% suplemento de crescimento de queratinócitos humanos (HKGS, S-001-5, Gibco®, Massachusetts, EUA), 1% penicilina/estreptomicina (PenStrep, 15140-122, Gibco®, Waltham, EUA), e 0,6 mM cloreto de cálcio (CaCl₂, 50-9703, Gibco®, Waltham, EUA). As culturas 2D de queratinócitos N/TERT-1 foram mantidas em *T-flasks* de 182.5 cm² (734-2315, VWR, Radnor, EUA) com meio de queratinócitos sem sêrum (K-SFM, 17005-034, Gibco®, Waltham, EUA) suplementado com 1% PenStrep, 0,2 ng/mL fator de crescimento epidérmico (EGF, 10450-013, Gibco®, Waltham, EUA), 25 mg/mL extrato pituitário bovino (BPE, 13028-014, Gibco®, Waltham, EUA) e 0,4 mM CaCl₂.

O material biológico foi mantido em azoto líquido até ser utilizado. A descongelação iniciou-se com a colocação do tubo de criopreservação em gelo e posterior transferência para um banho de água a 37°C, até o seu conteúdo estar completamente descongelado. Em seguida, diluiu-se a solução de congelação em meio de cultura, perfazendo um volume total de 15 mL para *T-flasks* de 75 cm² e 20 mL para *T-flasks* de 182.5 cm². Os *T-flasks* foram mantidos a 37°C com uma atmosfera com 5% CO₂. Após 24 horas, procedeu-se à troca do meio de cultura por forma a eliminar os resíduos de dimetilsulfóxido (DMSO, 276855, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) cuja citotoxicidade é potenciada pelo aumento da temperatura após a descongelação⁷⁵.

O crescimento das culturas celulares foi diariamente monitorizado através da sua observação microscópica (Eclipse TE2000-S, Nikon, Tóquio, Japão) e, sempre que a confluência desejada foi atingida, as células foram passadas de forma a obter sub-culturas. A confluência e densidade celular são descritas na literatura como parâmetros fundamentais para a regulação das propriedades biológicas e bioquímicas dos queratinócitos⁷⁶. Em particular, sabe-se que a sua diferenciação terminal é mediada pelo contacto entre células^{77,78}. Desta forma, as culturas de HEK_n foram mantidas numa densidade até 70% de confluência, enquanto as culturas de queratinócitos N/TERT-1 foram mantidas até 35% de confluência. Para expandir as culturas celulares lavaram-se os *T-flasks* com tampão fosfato salino (PBS, 10010-015, Gibco®, Waltham, EUA), seguindo-se a adição de tripsina- ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,05% (25300-062, Gibco®, Waltham, EUA), e incubação a 37°C numa atmosfera com 5% CO₂ durante 5 minutos, de modo que os queratinócitos se destacassem da superfície dos *T-flasks*. Para neutralizar a ação da tripsina, adicionou-se meio de cultura com soro fetal bovino (FBS, A3160802, Gibco®, Waltham, EUA), que é rico em proteases. No caso dos HEK_n, o meio *Epilife* foi suplementado com 1% HKGS, 1% PenStep, 0,6 mM CaCl₂ e 2% FBS. Para os queratinócitos da linha celular N/TERT-1, utilizou-se uma mistura composta por 50% meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 21068-028, Gibco®, Waltham, EUA), e 50% meio F12 de Ham (11765-054, Gibco®, Waltham, EUA), suplementada com 1% PenStrep e 10% FBS. Por fim, uma concentração de 3 x 10⁵ células/mL (HEK_n) ou 5 x 10⁵ células/mL

(N/TERT-1), juntamente com o volume apropriado de meio de cultura, foram adicionados a um novo *T-flask*.

Para congelar células, os passos iniciais são iguais aos da subcultura; após a lavagem com PBS e a incubação com tripsina, procedeu-se à centrifugação (Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech, Hanau, Alemanha) a 900g para HEKn e 450g para N/TERT-1, à temperatura ambiente durante 5 minutos. O *pellet* obtido foi depois ressuscitado em 1 mL de solução de congelação (90% meio de cultura respetivo, 10% DMSO) em tubos de criopreservação, que foram armazenados a -80°C durante 24 horas antes de serem transferidos para o azoto líquido.

3.2. Construção de modelos de epiderme 3D com HEKn

Ao atingirem 70% de confluência, as células foram sujeitas à ação proteolítica da tripsina e centrifugadas a 900g, durante 5 minutos, de forma a isolar as células em suspensão. De seguida, ressuscitou-se o *pellet* celular obtido em 300 µL meio de cultura rico em cálcio (meio Epilife suplementado com 1% HKGS, 1% PenStrep, 1,5mM CaCl₂). Para avaliar o número de células viáveis procedeu-se à realização do ensaio do azul tripano, no qual se diluem 10 µL da suspensão celular previamente obtida em 90 µL de azul tripano 0,4% (T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e contam-se as células vivas que, ao contrário das células não viáveis, não se apresentam coradas de azul.

Depois de contados os queratinócitos viáveis, 3 x 10⁵ células/mL foram semeadas em 500 µL de meio de cultura rico em cálcio, em *inserts* de cultura celular (PIHP01250, Millicell®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) previamente colocados numa placa de cultura de 6 poços (734-2777, VWR, Radnor, EUA). A cada poço da placa de cultura adicionaram-se 2,5 mL de meio rico em cálcio, seguindo-se a sua incubação durante 24 horas a 37°C numa atmosfera com 5% CO₂. No dia seguinte, removeu-se o meio de cultura presente no interior dos *inserts* e substituiu-se o meio do exterior por 1,5 mL de meio rico em cálcio suplementado com 1% fator de crescimento de queratinócitos (KGF, 711702, BioLegend, São Diego, EUA) e 50 mg/mL vitamina C (49752, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), iniciando a exposição do modelo à ALI. Nesta fase, apenas a parte basolateral das células permanece imersa em meio de cultura, estando a parte apical exposta ao ar. O sistema de exposição à ALI recapitula mais fielmente as características fisiológicas da epiderme *in vivo*, permitindo que a diferenciação e estratificação dos queratinócitos ocorra de forma mais completa⁶³. O modelo permaneceu durante 12 dias na fase de ALI, trocando-se o meio de cultura a cada 2-3 dias (Figura 3.1).

3.3. Construção de modelos de epiderme 3D com a linha celular N/TERT-1

Para o desenvolvimento de modelos epidérmicos com queratinócitos da linha celular N/TERT-1, revestiram-se os *inserts* de cultura celular com 100 µL de colagénio tipo I de cauda de rato (354249, Corning®, Corning, EUA) diluído em etanol 70% (UN1170, Valente e Ribeiro Lda, Lisboa, Portugal), numa concentração final de 0,75 mg/mL. Os *inserts* foram revestidos 24 horas antes das células serem semeadas, sendo deixados durante a noite na câmara de fluxo laminar, por forma a garantir a evaporação do excedente de etanol. Depois disto, a proteólise foi obtida através do uso de tripsina e, posteriormente, as células foram centrifugadas a 450g durante 5 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de meio K-SFM suplementado com 1% PenStrep, 0,2 ng/mL EGF, 25 mg/mL BPE e 0,4 mM CaCl₂. De seguida, realizou-se o ensaio do azul tripano para determinar o número de células viáveis. Semearam-se 3,6 x 10⁵ células/mL em 500 µL de meio K-SFM 0,4mM CaCl₂ e adicionaram-se 2,5 mL do mesmo meio a cada poço da placa de cultura que, posteriormente, foi incubada durante 48 horas a 37°C com 5% CO₂. Decorrido este período substituiu-se o meio exterior aos *inserts* por meio K-SFM suplementado com 1% PenStrep, 0,2 ng/mL EGF, 25 mg/mL BPE e 1,5 mM CaCl₂. Ao fim de 24 horas o modelo foi exposto à ALI através da remoção total do meio de cultura existente no interior dos *inserts* e da substituição do meio

exterior por meio K-SFM 1,5 mM CaCl_2 suplementado com 10 ng/mL KGF e 50 mg/mL vitamina C. Durante 14 dias o modelo foi mantido na ALI, sendo o meio de cultura trocado a cada 2-3 dias (Figura 3.2).

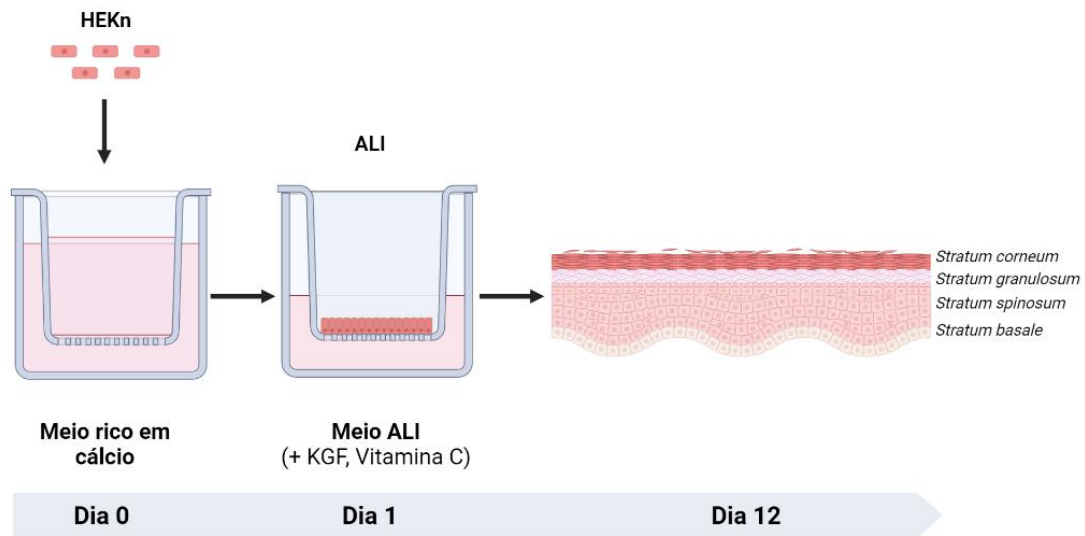


Figura 3. 1 Representação esquemática do protocolo seguido para o desenvolvimento de epidermes 3D usando HEKn. Os queratinócitos foram semeados em *inserts* de cultura celular com membranas porosas de policarbonato ao dia 0. Durante 24 horas as células encontraram-se submersas em meio rico em cálcio. Ao fim desse período, removeu-se o meio de cultura e o modelo foi exposto à ALI (dia 1), durante a qual a superfície apical dos queratinócitos contacta com o ar e a superfície basolateral está em contacto com o meio de cultura ALI (meio *Epilife* rico em cálcio suplementado com KGF e vitamina C). O meio de cultura presente no exterior dos *inserts* foi trocado a cada 2-3 dias, durante 12 dias. Ilustração criada em BioRender.com.

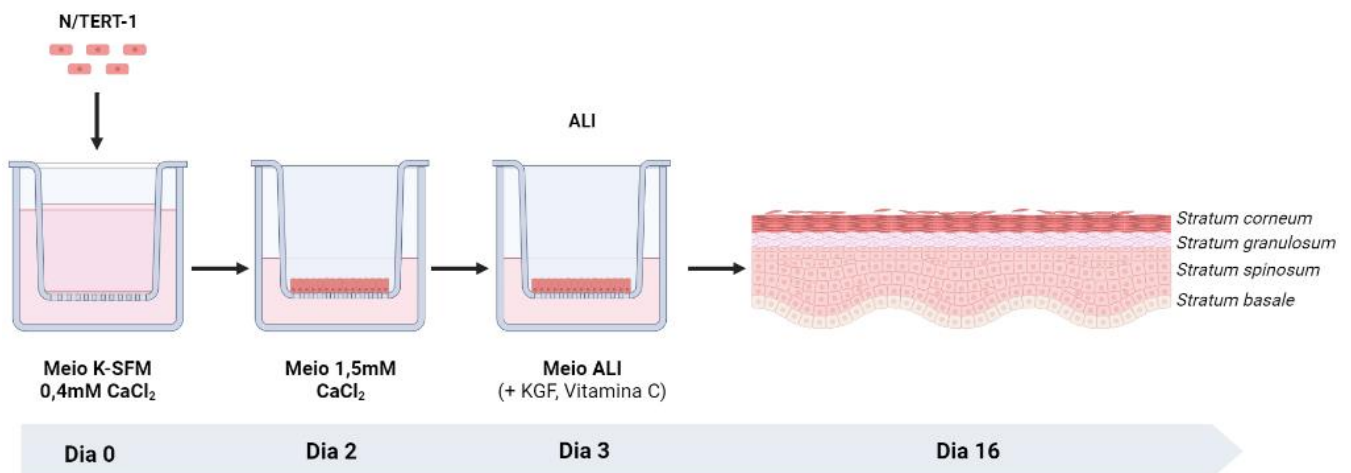


Figura 3. 2 Representação esquemática do protocolo seguido para o desenvolvimento de epidermes 3D usando a linha celular N/TERT-1. Os queratinócitos foram semeados em meio K-SFM 0,4mM CaCl_2 (dia 0) e, após 48 horas, procedeu-se à troca por meio de cultura com uma concentração de cálcio mais elevada, permanecendo o modelo na fase submersa (dia 2). O modelo foi exposto à ALI ao fim de 24 horas (dia 3), através da remoção total do meio de cultura previamente existente e pela adição de meio de cultura ALI (meio K-SFM 1,5mM CaCl_2 suplementado com KGF e vitamina C) no exterior do *insert*, deixando a membrana de policarbonato, onde as células foram semeadas, exposta ao ar. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias, durante 14 dias. Ilustração criada em BioRender.com.

3.4. Desenvolvimento de modelos 3D de epiderme inflamada

Para induzir respostas inflamatórias por parte dos queratinócitos, submeteram-se os modelos epidérmicos 3D à ação da radiação UV-B e do $\text{TNF-}\alpha$. Antes da exposição dos modelos aos agentes inflamatórios procedeu-se à recolha do meio de cultura presente no exterior dos *inserts* e respetivo armazenamento a -20°C , para posterior análise.

A fim de otimizar a concentração de TNF- α capaz de despoletar uma resposta inflamatória, trataram-se os modelos de epiderme com diferentes concentrações do mesmo. Tendo como referência o estudo desenvolvido por Wufuer *et al.*, 2012 foram testadas as seguintes concentrações: 0, 25, 50, 75, 100, 120, 150 e 200 ng/mL. Para tal, no último dia de exposição à ALI, diluiu-se o volume adequado de TNF- α (A42552, Invitrogen, Waltham, EUA) em meio de cultura suplementado com KGF e vitamina C e adicionaram-se 1,5 mL ao exterior dos *inserts* durante 24 e 48 horas. Depois disto, o meio de cultura foi recolhido e armazenado a -20°C para posterior análise.

A exposição das epidermes 3D à radiação UV-B realizou-se no último dia da ALI, através do uso de lâmpadas UV-B (G8T5.E, Sanko Denki Co., Kanagawa, Japão). Para isso, o sistema foi ligado 15 minutos antes da irradiação das amostras biológicas, de forma a garantir um fluxo de radiação estável⁸⁰. Findado o tempo de pré-aquecimento das lâmpadas, colocaram-se as amostras sob a fonte artificial de radiação UV-B. O intervalo de tempo durante o qual cada amostra foi exposta à radiação UV-B dependeu da dose pretendida e da irradiância medida pelo radiómetro (em $\mu\text{W cm}^{-2}$) (6.2 Sensitive UVB Meter, Solarmeter®, Glenside, EUA), tendo sido calculado através da Equação 3.1, previamente descrita na literatura por Diffey, 2002:

Equação 3. 1

$$\text{Tempo de exposição (minutos)} = \frac{1000 \times \text{Dose pretendida (J cm}^{-2}\text{)}}{60 \times \text{Irradiância (mW cm}^{-2}\text{)}}$$

Tendo em consideração que:

$$1 \mu\text{W cm}^{-2} = 0,001\text{mW cm}^{-2}$$

$$1 \text{mW cm}^{-2} = 1 \text{mJ s}^{-1} \text{cm}^{-2}.$$

Os tempos de exposição final (em segundos) para cada intensidade de radiação UV-B (em mJ/cm²) encontram-se indicados na Tabela 3.1. Testaram-se várias intensidades de radiação UV-B emitida (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90 mJ/cm²)^{82,83}, de forma a determinar o valor ótimo capaz de provocar alterações bioquímicas nos queratinócitos, sem provocar necrose dos tecidos. Logo após colocaram-se novamente os *inserts* na placa de cultura, com 1,5 mL de meio de cultura suplementado com KGF e vitamina C no seu exterior e incubou-se a placa a 37°C com 5% CO₂. Ao fim de 48 e 96 horas o meio de cultura foi recolhido e armazenado a -20°C.

3.5. Análise histológica e imunohistoquímica

Os *inserts* foram fixados numa solução de formalina 10% (05-01004F, Bio-Optica, Milão, Itália) durante 24 horas. Decorrido esse período, as membranas sobre as quais as epidermes 3D cresceram foram destacadas dos *inserts* e colocadas em cassetes histológicas, igualmente imersas na solução de fixação durante 24 a 48 horas.

A incorporação das amostras em parafina, assim como a realização de cortes histológicos e marcação com Hematoxilina e Eosina (H&E) foram realizadas no serviço de Histopatologia do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC). De forma sucinta, desidrataram-se as amostras em soluções de etanol com concentração crescente (70 a 99,9%), seguindo-se a imersão em xilol, que atua como agente intermédio entre o agente desidratante (etanol) e o meio de impregnação (parafina). Após a solidificação da parafina na qual se dá a inclusão das amostras, procedeu-se ao corte sagital dos blocos em secções de 3 μm de espessura, com um micrótopo (HistoCore Autocut, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Para a marcação H&E, as amostras foram desparafinadas e hidratadas em soluções de etanol com concentrações decrescentes

(99,9% a 70%) e em água. Aplicou-se a hematoxilina (corante básico, azul), que marca os núcleos, e após imersão em ácido clorídrico 0,5%, água e etanol, colocou-se a eosina (corante ácido, rosa), que marca o citoplasma. Para finalizar, desidrataram-se novamente as amostras, que foram colocadas em xilol até serem montadas.

A avaliação da atividade proliferativa das células basais foi feita por análise imunohistoquímica para o marcador de proliferação Ki-67, no serviço de anatomia patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG), recorrendo a um sistema automatizado para coloração de lâminas (BenchMark ULTRA IHC/ISH System, Roche Diagnostics, Basileia, Suíça). A recuperação antigénica, uma etapa necessária para permitir a ligação dos anticorpos às proteínas de interesse, foi efetuada de acordo com o método CC1 *standard*, no qual os cortes histológicos são imersos numa solução de Tris-EDTA (pH=8) e aquecidos a altas temperaturas. As amostras foram incubadas com o anticorpo Ki-67 durante 28 minutos.

Tabela 3. 1 Diferentes intensidades de radiação UV-B (em miliJoules por centímetro quadrado (mJ/cm²)) e respetivos tempos de exposição (em segundos (s)) aplicados nas epidermes 3D.

Intensidade da radiação (mJ/cm ²)	Tempo de exposição (s)
10	16
20	31
30	47
40	63
50	79
60	95
75	118
90	142

3.6. Imunofluorescência

A estrutura e funcionalidade dos modelos epidérmicos 3D foi avaliada através da deteção, por imunofluorescência, de biomarcadores representativos dos diferentes estádios de diferenciação dos queratinócitos. Para isto, analisou-se a expressão da K10, K14 e INV. Adicionalmente, avaliou-se também o nível de atividade fisiológica das células através da marcação com K6 e K17.

Para dissolver a parafina que cobre os cortes histológicos, colocaram-se as lâminas numa estufa seca (WTB Binder, Tuttlingen, Alemanha) a 65°C durante 30 minutos, seguindo-se a imersão em HistoChoice® (H2779, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) durante 10 minutos para completar a desparafinação. Depois disto, as amostras foram hidratadas em três soluções com um gradiente de etanol decrescente (100%, 90% e 70%), durante 5 minutos em cada solução. A isto seguiu-se a imersão em água bidestilada durante 5 minutos. Para o passo de recuperação antigénica as lâminas foram imersas em tampão citrato (pH = 6) e levadas ao micro-ondas (800 W) durante 20 minutos. No final, as lâminas foram deixadas a arrefecer, à temperatura ambiente, na própria solução por 20 minutos. Seguidamente, lavaram-se as amostras com PBS/Tween 20 0,05% três vezes (2 minutos por lavagem) para potenciar a

permeabilidade dos tecidos. Cobriram-se as amostras com uma solução de bloqueio composta por PBS e albumina do soro bovino (BSA, A9647, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 1%, durante 30 minutos para a anti-K14 e 15 minutos para a anti-K10, anti-INV, anti-K6 e anti-K17. Os seguintes anticorpos primários foram diluídos na solução de bloqueio nas seguintes proporções: anti-K14 (1:500, ab7800, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-K10 (1:100, ab9026, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-INV (1:200, SAB4200794, Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA), anti-K6 (1:100, ab93279, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e anti-K17 (1:250, ab51056, Abcam, Cambridge, Reino Unido). As amostras foram incubadas com o anticorpo primário durante a noite numa atmosfera húmida, protegida da luz e a 4°C. Para cada lâmina teve-se um controlo negativo, através da incubação da amostra apenas com a solução de bloqueio. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido lavando as lâminas em PBS/Tween 20 0,05% três vezes, durante dois minutos por lavagem. Adicionaram-se os respetivos anticorpos secundários, anti-mouse FITC (1:500, F0257, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e anti-rabbit 488 (1:1000, A-11008, Invitrogen, Waltham, EUA), previamente diluídos na solução de bloqueio, e incubaram-se as lâminas durante 2 horas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Depois disto, removeu-se o anticorpo secundário através da lavagem das lâminas em PBS/Tween 20 0,05% três vezes, durante dois minutos. Adicionou-se uma gota de meio ProLong™ *Gold Antifade Mountant* com DAPI (P36935, Invitrogen, Waltham, EUA) para corar o núcleo das células e cobriram-se as lâminas com uma lamela, fixada com verniz. As amostras foram armazenadas a 4°C, na escuridão, para usos posteriores.

3.7. ELISA

A quantificação da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) pelos queratinócitos realizou-se através de ELISA *sandwich*. Nesta técnica um anticorpo específico (anticorpo de captura), adsorvido na superfície da placa, imobiliza a proteína de interesse (antigénio), que se liga a um segundo anticorpo (anticorpo de deteção). O anticorpo de deteção é acoplado a um complexo enzimático que reage com um substrato, produzindo uma reação colorimétrica em que a intensidade da coloração é proporcional à concentração do antigénio na amostra em estudo⁸⁴.

O protocolo foi executado com *kits* comerciais para a deteção de IL-1 β (437007, BioLegend, São Diego, EUA) e IL-6 (430507, BioLegend, São Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e seguindo o esquema apresentado na Figura 3.3. Para eliminar quaisquer anticorpos de captura que não se encontrassem fixados na base dos poços, inicialmente, a placa foi lavada 4 vezes com uma solução de lavagem. De seguida, adicionaram-se 50 μ L de solução tampão por poço, com o objetivo de bloquear quaisquer locais de ligação na placa não ocupados por anticorpos de captura, prevenindo ligações inespecíficas. Acrescentaram-se 100 μ L das soluções *standard* (com concentração conhecida dos antigénios em estudo), previamente diluídas serialmente (IL-6: 500-7,8 pg/mL; IL-1 β : 125-2 pg/mL) e 100 μ L das amostras de meio de cultura previamente recolhido no decorrer dos ensaios. Testou-se também a reatividade do meio de cultura utilizado na fase de exposição à ALI, adicionando-se 100 μ L. Como controlo negativo foi utilizada a solução tampão. Depois disto a placa foi incubada 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação, para potenciar a ligação entre o antigénio e o anticorpo de captura. No final do período de incubação, qualquer antigénio que não se tivesse ligado ao anticorpo de captura foi removido através de um ciclo de 4 lavagens. A seguir, adicionaram-se 100 μ L da solução que continha o anticorpo de deteção e a placa foi novamente incubada, por 1 hora, nas condições previamente descritas. Após as lavagens adicionaram-se 100 μ L da solução que continha o complexo enzimático avidina-peroxidase de rábano (HRP), e o sistema foi incubado por 30 minutos sob as mesmas condições, promovendo a ligação ao anticorpo de deteção. De seguida, lavou-se a placa 5 vezes, com intervalos de 30 segundos a 1 minuto por lavagem. Depois da incubação e lavagem, caso existissem antigénios na amostra a analisar, estes não poderiam ser removidos já que se encontravam conectados ao anticorpo de captura e respetivo complexo

enzimático. Para refletir a atividade enzimática adicionaram-se 100 μ L por poço de uma solução que continha o substrato da enzima e incubou-se a placa durante 20 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. Nesta fase, a presença das citocinas foi evidenciada através do desenvolvimento de uma coloração azul. A reação enzimática foi terminada com a adição de 100 μ L por poço de uma solução *stop*. Por fim, a densidade ótica da reação foi lida num espectrofotómetro (Spectra MAX 340, Molecular Devices, São José, EUA), a 450 e 570 nm, e comparada com a densidade ótica das soluções *standards* para determinar a concentração de citocinas presentes em cada amostra.

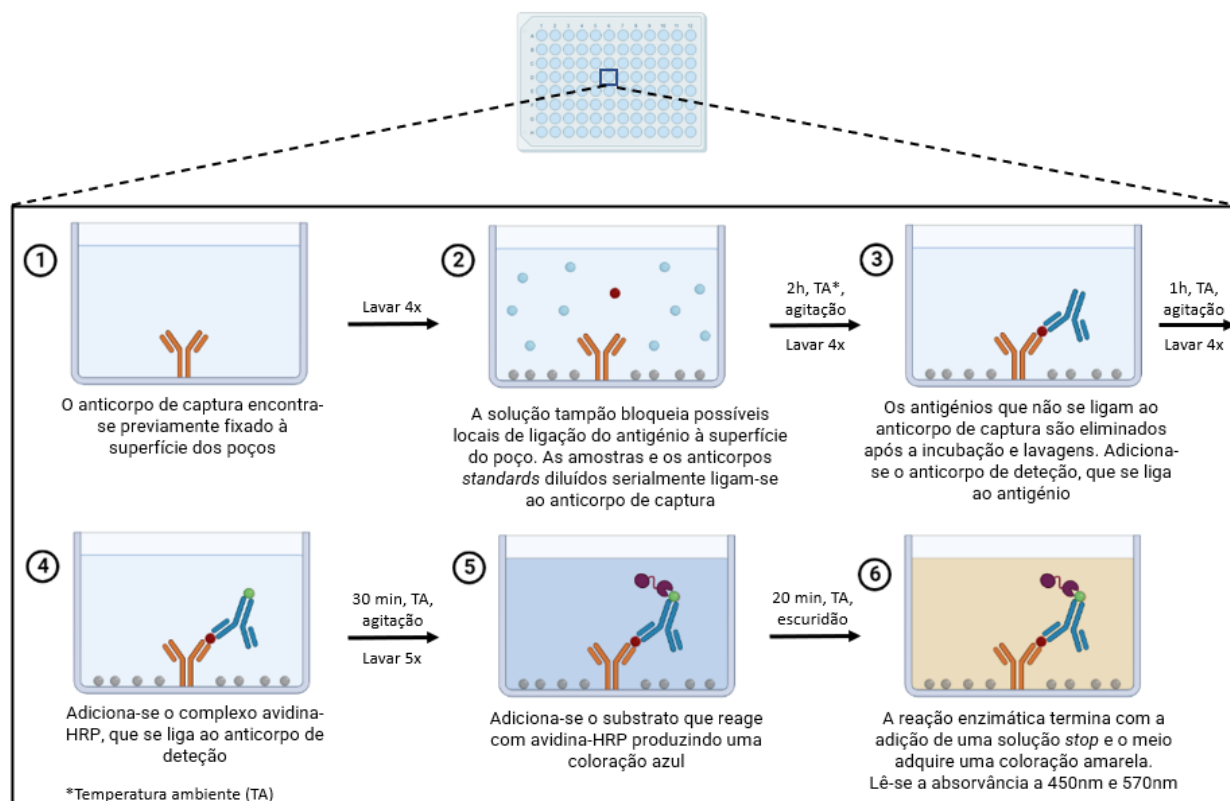


Figura 3. 3 Representação esquemática do protocolo seguido para a realização de um ELISA *sandwich*. Em cada poço de uma placa com 96 poços revestidos com o anticorpo de captura é adicionada a amostra a analisar. O antígeno liga-se ao anticorpo de captura e, posteriormente, é adicionado um anticorpo de detecção que se liga ao complexo anticorpo de captura-antígeno. Adiciona-se a avidina-HRP que se liga ao anticorpo de detecção e, em seguida, o substrato para que a reação enzimática possa ocorrer. A reação é terminada com a adição de uma solução *stop* e a absorvância é lida nos comprimentos de onda indicados. Ilustração criada em BioRender.com.

3.8. Análise de dados e microscopia

As imagens da marcação H&E, assim como as imagens de fluorescência foram adquiridas com recurso ao microscópio ótico, equipado com uma câmara (Evolution MP, Media Cybernetics Inc., Rockville, EUA). O *merge* das imagens foi efetuado no Adobe® Photoshop 2020 (Adobe®, São José, EUA). O mesmo programa foi utilizado para a análise da espessura das epidermes. Para isso, efetuaram-se medições em três regiões diferentes dos cortes histológicos. O cálculo da média das medições obtidas e do desvio padrão (DP), assim como as representações gráficas, foram realizadas através do GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, São Diego, EUA).

Os dados obtidos a partir do ELISA foram, numa primeira instância, analisados com recurso ao *software* Microsoft® Excel® (versão 2203, Microsoft Corporation, Redmond, EUA) para obtenção das curvas de calibração de cada citocina. Avaliou-se a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk e, perante dados com distribuição normal, calculou-se a significância estatística através da análise de variância (ANOVA) unilateral. Quando a normalidade dos dados não foi verificada utilizou-se o teste

de Kruskal-Wallis (alternativa não paramétrica). Para todos os testes estatísticos realizados foi considerado um nível de significância estatística de 5%. Os dados encontram-se representados através da média \pm DP e a análise estatística e respetiva representação gráfica foi realizada com recurso ao programa GraphPad Prism 9.

4. Resultados

4.1. Modelo 3D epidérmico com HEKn

As células primárias são obtidas diretamente a partir dos tecidos corporais e a sua cultura é estabelecida sob condições otimizadas. Por serem derivadas dos tecidos nativos e não sofrerem qualquer modificação, são consideradas excelentes sistemas modelo que se aproximam, ainda que não totalmente, das condições fisiológicas verificadas no organismo intacto, *in vivo*⁸⁵. Através do protocolo previamente otimizado no laboratório e descrito na secção 3.2, elaborou-se um modelo 3D de epiderme utilizando HEKn. A análise histológica do modelo epidérmico desenvolvido revelou uma organização estrutural semelhante à verificada *in vivo*, indicadora do processo de diferenciação característico dos queratinócitos da epiderme humana. O *stratum basale* pôde ser identificado na camada mais interna de células colunares, organizadas de forma contígua. O *stratum spinosum* distinguiu-se pela morfologia mais alongada das células e, imediatamente acima, o *stratum granulosum* foi caracterizado pela presença de grânulos no interior dos queratinócitos. Verificou-se ainda a existência do *stratum corneum*, composto por corneócitos terminalmente diferenciados e achatados, indicando o fim do processo de maturação destas células (Figura 4.1 A). A atividade proliferativa característica dos queratinócitos do *stratum basale* foi evidenciada pela expressão do biomarcador proliferativo Ki-67, uma proteína que se acumula no núcleo durante a mitose (Figura 4.1 B)⁸⁶.

O processo de diferenciação espaço-temporal da epiderme é caracterizado pela expressão de diferentes proteínas, que podem ser utilizadas como biomarcadores. Na epiderme humana saudável, existe uma mudança da expressão de K14 para K10 à medida que os queratinócitos migram para as camadas superiores e se tornam mais diferenciados^{87,88}. No modelo 3D epidérmico produzido verificou-se que a K14 era sobretudo expressa na camada basal, existindo, porém, alguma expressão nas camadas superiores (Figura 4.1 C). Pelo contrário, a K10 não foi expressa pelos queratinócitos do *stratum basale*, fazendo-se notar no *stratum spinosum* e estendendo a sua expressão até às camadas superiores (Figura 4.1 D). A INV é produzida nas camadas mais externas da epiderme, fazendo parte do envelope cornificado característico das células do *stratum corneum*^{89,90}. No modelo 3D epidérmico, a expressão deste marcador restringiu-se às camadas suprabasais, e em especial ao *stratum corneum*, revelando uma maturação completa da epiderme (Figura 4.1 E). Analisou-se também a expressão da K6 e da K17, que funcionam como marcadores de ativação dos queratinócitos¹⁵. Os resultados obtidos mostram a existência de expressão da K6 ao longo de toda a epiderme (Figura 4.1 F) e expressão da K17, ainda que muito pouco intensa, no *stratum basale* e no *stratum granulosum* (Figura 4.1 G).

4.1.1. Efeitos da radiação UV-B no modelo 3D epidérmico com HEKn, 48 horas após a exposição

Um dos objetivos deste projeto prendeu-se com a análise dos efeitos inflamatórios provocados pela exposição das epidermes 3D a uma fonte artificial de radiação UV-B. Para isso, as epidermes foram sujeitas a intensidades crescentes de radiação, tendo-se analisado os respetivos efeitos dessa exposição na sua morfologia e na expressão de biomarcadores característicos do normal desenvolvimento epidérmico e da ativação celular.

Ao analisar os cortes histológicos dos modelos 3D 48 horas após a exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm² de radiação UV-B observou-se que a morfologia das epidermes não foi afetada, tendo sido possível distinguir as diferentes camadas que caracterizam uma epiderme totalmente diferenciada (Figura 4.2).

Adicionalmente, não foi verificada hiperqueratinose (i.e., espessamento do *stratum corneum*) nem hiperplasia epidérmica, sendo estas duas condições características da ação de intensidades excessivas de radiação UV nos tecidos epidérmicos (Figura 4.2 A, B, C)⁹¹.

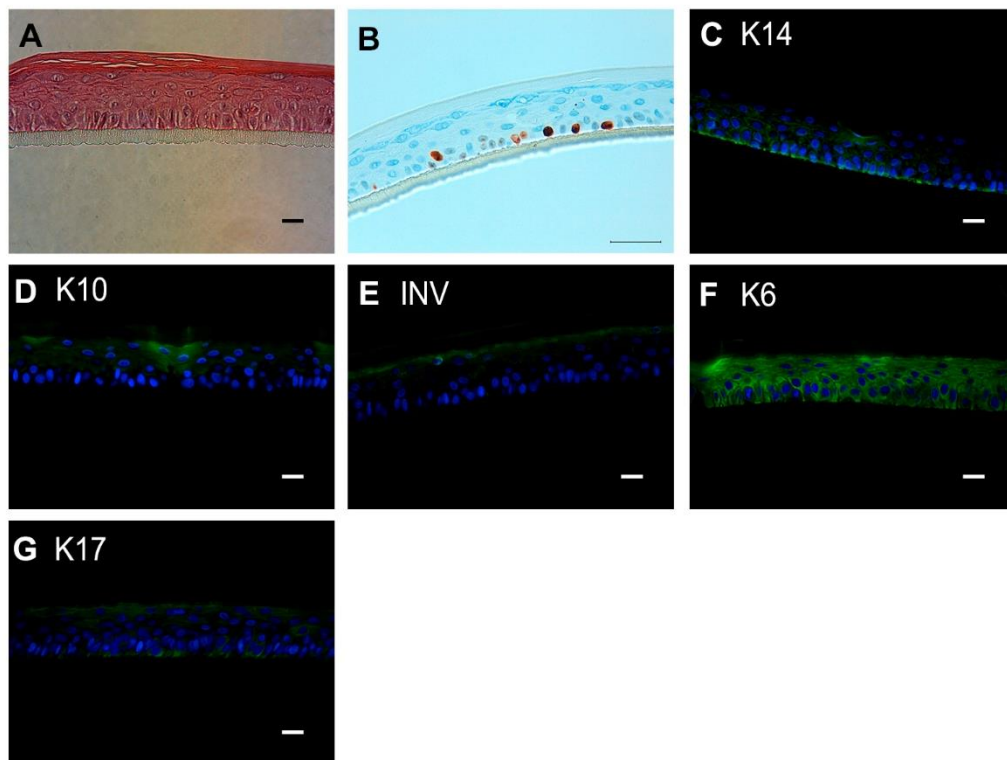


Figura 4. 1 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEKn, sem exposição à radiação UV-B. A marcação H&E revela a arquitetura multicamada do modelo 3D epidérmico (A). A proliferação celular na camada basal é evidenciada pela marcação com Ki-67 (a castanho) (B). A expressão da K14 (C), K10 (D), INV (E), K6 (F) e K17 (G) encontra-se representada a verde e os núcleos estão marcados com DAPI (azul). Foram realizados três ensaios independentes (n=3). A barra da escala equivale a 25 μ m (A, C-G) e a 50 μ m (B).

Relativamente à expressão dos biomarcadores característicos do desenvolvimento da epiderme, verificou-se que nos modelos expostos a 10 e 20 mJ/cm² a expressão da K14 localizou-se maioritariamente na camada inferior da epiderme (Figura 4.2 D, E). No que respeita à epiderme exposta a 30 mJ/cm², a expressão deste marcador não se mostrou limitada aos estratos mais internos, estando presente ao longo de todo o tecido (Figura 4.2 F). A K10 foi expressa nas camadas superiores, mas não foi expressa pelo *stratum basale*, tendo-se isto verificado para as três condições em análise (Figura 4.2 G, H, I). De modo semelhante, a expressão da INV foi observada nas camadas mais externas, sobretudo no *stratum granulosum* e no *stratum corneum*, não havendo expressão na metade mais interna da epiderme (Figura 4.2 J, K, L). No que diz respeito à expressão dos marcadores de ativação dos queratinócitos, a K6 foi expressa de forma mais intensa pela epiderme sujeita a 20 mJ/cm², não estando esta expressão circunscrita às camadas superiores (Figura 4.2 N). As epidermes expostas a 10 e 30 mJ/cm² mostraram menor intensidade na expressão deste marcador, tendo esta sido verificada no *stratum granulosum* e no *stratum corneum* (Figura 4.2 M, O). No caso da K17, na epiderme exposta a 10 mJ/cm² a expressão foi menos intensa do que nas epidermes irradiadas com doses mais elevadas, verificando-se que esta expressão ocorreu sobretudo nas camadas suprabasais (Figura 4.2 P). Na epiderme exposta a 20 mJ/cm² a expressão deste marcador pôde ser observada com maior intensidade no *stratum granulosum*, apesar de também ser identificada no *stratum spinosum* (Figura 4.2 Q). A epiderme exposta a 30 mJ/cm² mostrou um padrão espacial de expressão da K17 distinto das epidermes irradiadas com intensidades inferiores, já que neste caso a expressão se fez notar no *stratum basale* e no *stratum spinosum* (Figura 4.2 R). Foi também analisada a atividade proliferativa do epitélio, através da marcação com o anticorpo Ki-67, tendo-se verificado que as epidermes

expostas à radiação UV-B (Figura 4.3 A, B, C) apresentavam maior quantidade de queratinócitos proliferativos, face à epiderme controlo (Figura 4.1 B).

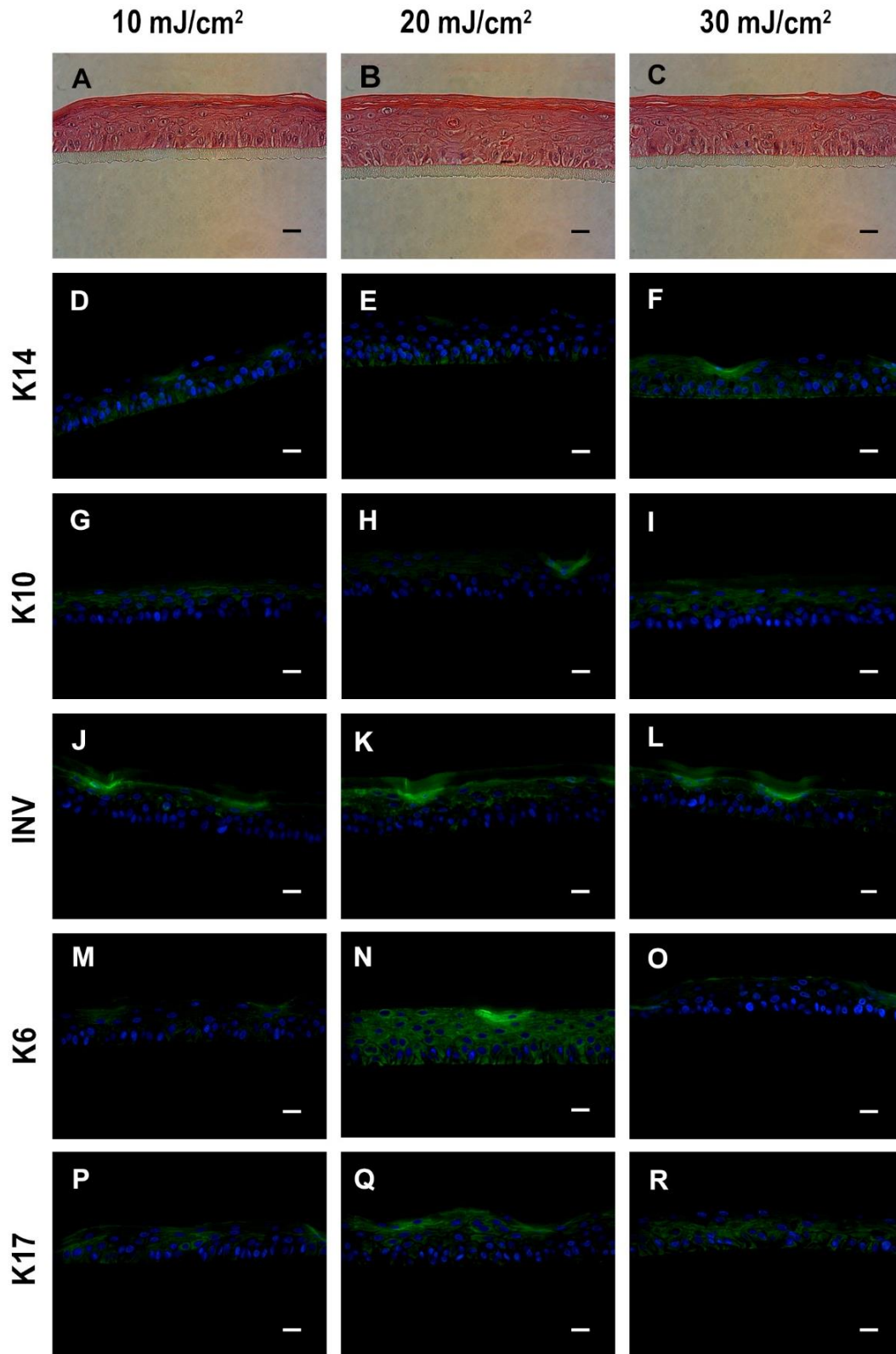


Figura 4. 2 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK, 48 horas após a exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm² de radiação UV-B. A histologia do modelo epidérmico é apresentada através da marcação H&E (A, B, C). A marcação por imunofluorescência mostra os padrões de expressão de biomarcadores (a verde) nas epidermes 3D e os núcleos das células a azul (DAPI) (D-R). A expressão da K6 e K17 foi mais intensa após a exposição a 20 mJ/cm² (N, Q). Foram realizados três ensaios independentes (n=3). A barra da escala equivale a 25µm em todas as imagens.

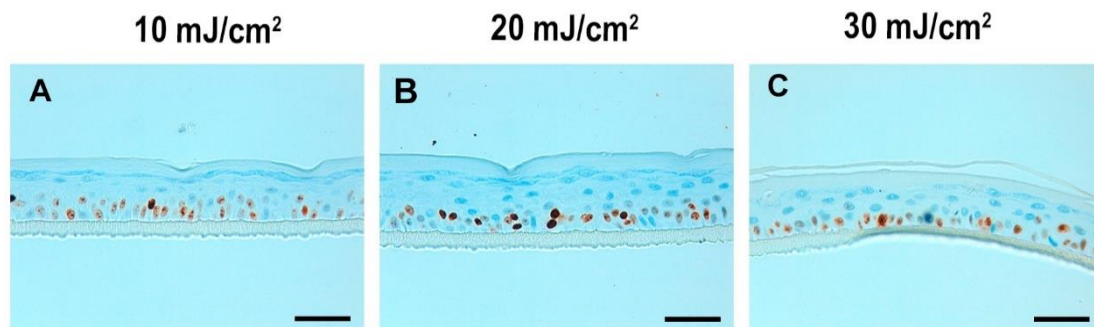


Figura 4. 3 Atividade proliferativa dos modelos epidérmicos 3D com HEKn 48 horas após exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm² de radiação UV-B. A marcação com Ki-67 mostra um aumento da proliferação das células do *stratum basale* (a castanho) após exposição a uma fonte artificial de radiação UV-B. A barra da escala equivale a 50µm em todas as imagens.

Para otimizar a intensidade de radiação UV-B capaz de despoletar uma resposta inflamatória nos queratinócitos sem danificar a morfologia da epiderme, os modelos 3D foram expostos a doses de radiação mais elevadas. Posto isto, foi estudada a influência da exposição a 40, 50 e 60 mJ/cm² de radiação UV-B, não tendo sido verificados danos ao nível da morfologia. Ao invés disso, foi possível identificar claramente as diferentes camadas epidérmicas, desde o *stratum basale*, formado por uma camada de células colunares, até ao *stratum corneum*, composto por células de morfologia achatada. Foi ainda possível distinguir as várias camadas que compõem o *stratum spinosum*, e também o *stratum granulosum* onde o citoplasma das células apresentava maior quantidade de grânulos de queratohialina (Figura 4.4 A, B, C). Relativamente à condição controlo, onde as epidermes 3D não sofreram a ação da radiação UV-B, nas epidermes expostas a 40 e 50 mJ/cm² foi possível verificar um aumento significativo na espessura, ao passo que a epiderme exposta a 60 mJ/cm² apresentou uma espessura ligeiramente inferior, ainda que sem significância estatística (Figura 4.5).

A marcação por imunofluorescência revelou que a expressão da K14 era notória ao longo de todas as camadas epidérmicas à exceção do *stratum corneum*, independentemente da intensidade de radiação UV-B a que as amostras foram sujeitas (Figura 4.4 D, E, F). A K10 e a INV apresentaram um padrão espacial de expressão semelhante, na medida em que ambas foram expressas pelas camadas mais externas estando a sua expressão ausente no *stratum basale* (Figura 4.4. G-L). A expressão da K6 ocorreu ao longo de toda a extensão das amostras, tendo sido mais intensa na epiderme exposta a 60 mJ/cm² (Figura 4.4 M, N, O). No que respeita à K17, pareceu ter existido um aumento de expressão com o aumento da intensidade de radiação UV-B, já que a epiderme exposta a 60 mJ/cm² apresentou uma marcação mais intensa face às restantes condições (Figura 4.4 P, Q, R).

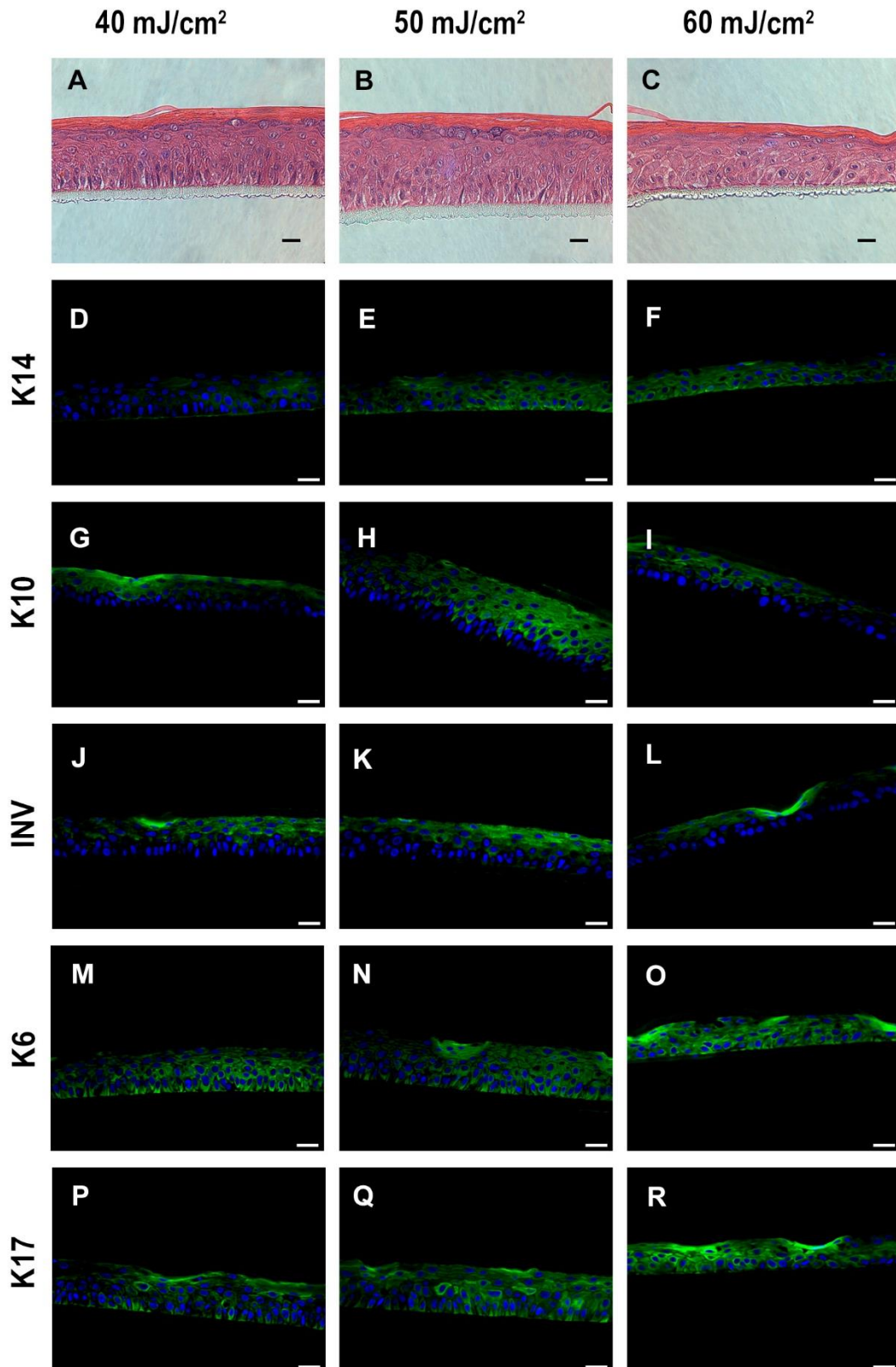


Figura 4. 4 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEKs, 48 horas após a exposição a 40, 50 e 60 mJ/cm² de radiação UV-B. A marcação H&E (A, B, C) evidencia a histologia da epiderme. A marcação por imunofluorescência revela os padrões de expressão de biomarcadores (a verde) e os núcleos das células marcados com DAPI (a azul) (D-R). A expressão da K6 e K17 foi mais intensa após a exposição a 60 mJ/cm² (O, R). Para cada condição foi apenas realizado um ensaio experimental (n=1). A barra da escala equivale a 25µm em todas as imagens.

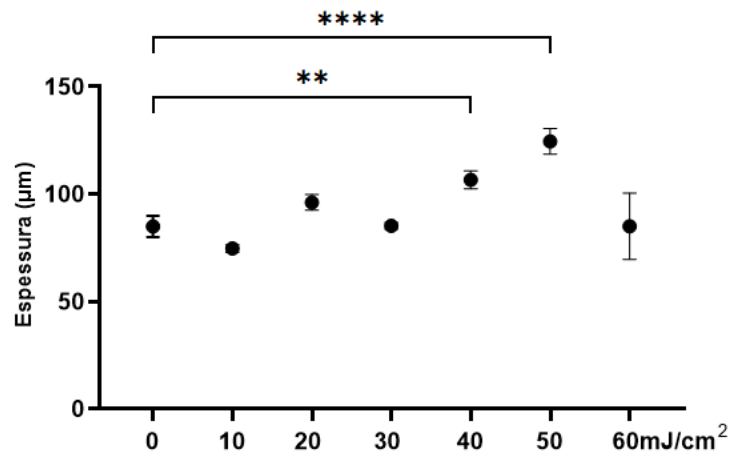


Figura 4.5 Espessura média das epidermes 3D com HEKn, 48 horas após a exposição a diferentes intensidades de radiação UV-B. As epidermes submetidas a 40 e 50 mJ/cm² apresentaram um aumento estatisticamente significativo da espessura face à condição controlo (0 mJ/cm²). Foram realizados três ensaios independentes para as intensidades de 10, 20 e 30 mJ/cm² (n=3). Para as intensidades de 40, 50 e 60 mJ/cm² foi apenas realizado um ensaio (n=1). Para cada amostra foram realizadas três medições. O DP refere-se às três medições feitas por amostra. Os asteriscos (*) representam a significância estatística face à situação controlo. ** (p<0.01); **** (p<0.0001).

Aquando da exposição a 75 e 90 mJ/cm² foi possível identificar alterações na organização estrutural da epiderme, tendo-se observado a existência de grandes lacunas entre o *scaffold* e o tecido epidérmico. Adicionalmente, foi possível verificar a existência de vacuolização celular, isto é, a presença de espaços livres no interior das células. Estas alterações contribuíram para a deterioração da organização celular e, consequentemente, da coesão tecidual, não tendo sido observada a estrutura típica epidérmica à exceção do *stratum corneum* (Figura 4.6).

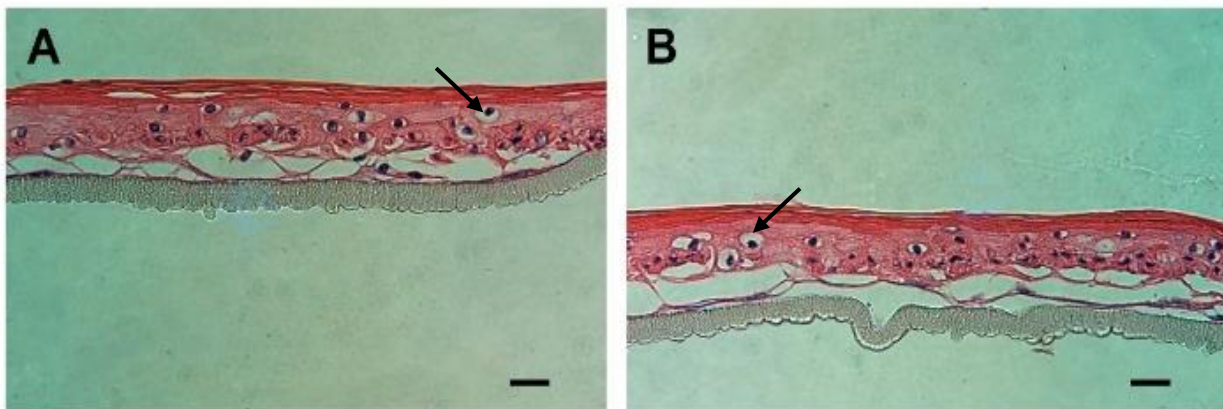


Figura 4.6 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com HEKn, por análise histológica, 48 horas após a exposição a 75 e 90 mJ/cm² de radiação UV-B. A marcação H&E revela a disrupção do tecido epidérmico após a estimulação com 75 (A) e 90 mJ/cm² (B). As setas assinalam a presença de espaços intracelulares livres possivelmente causados pela elevada intensidade da radiação UV-B. A barra da escala equivale a 25µm em todas as imagens, (n=1).

Para estudar a influência da exposição à radiação UV-B na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1β) pelos queratinócitos, o meio de cultura recolhido 48 horas após a exposição foi analisado por ELISA. De acordo com os resultados obtidos, relativamente à situação controlo (0 mJ/cm²), constatou-se que a exposição à radiação UV-B provocou aumentos na expressão de IL-6, tendo este sido estatisticamente significativo após a exposição a 30 mJ/cm². O mesmo foi observado para as intensidades mais elevadas, observando-se uma tendência crescente nos níveis de expressão desta citocina a partir dos 50 mJ/cm², até aos 90 mJ/cm², onde foi verificada a maior expressão (Figura 4.7 A). Relativamente à IL-1β não foi verificada uma relação entre o aumento da intensidade da radiação UV-B e os níveis de expressão desta

citocina. Ao invés disso, apenas foi observado um aumento estatisticamente significativo após a estimulação com 20 e 30 mJ/cm², face ao controlo. Verificou-se ainda que existiu um aumento após a exposição a 90 mJ/cm² ainda que sem significância estatística (Figura 4.7 B).

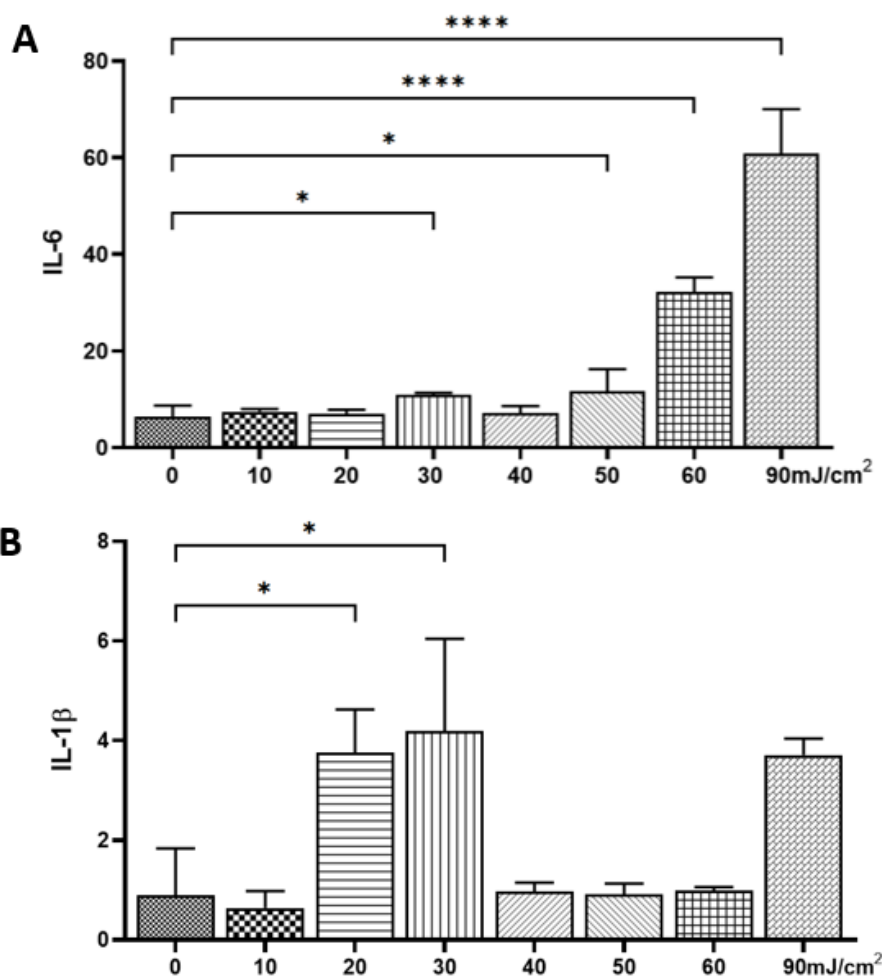


Figura 4.7 Níveis de citocinas secretadas pelos HEKs, 48 horas após a exposição a diferentes intensidades de radiação UV-B. Os níveis de IL-6 (A) e IL-1β (B) libertadas pelos HEKs no meio de cultura foram medidos por ELISA. As barras mostram a média ± DP. Para cada condição foram realizadas três análises independentes (n=3). Os asteriscos (*) representam a significância estatística face à situação controlo (0 mJ/cm²). * (p≤0.05); **** (p≤0.0001).

4.1.2. Efeitos da radiação UV-B no modelo 3D epidérmico com HEKs, 96 horas após a exposição

Para averiguar os efeitos da radiação UV-B na morfologia e na expressão dos marcadores epidérmicos passado algum tempo, os modelos 3D foram analisados quatro dias (96 horas) após a estimulação. Os resultados mostram que a espessura das epidermes diminuiu à medida que a intensidade da radiação aumentou (Figura 4.8), tendo a epiderme exposta a 30 mJ/cm² apresentado uma espessura ligeiramente inferior à do controlo, revelando alguma ausência de estratificação (Figura 4.9 D). Apesar disso, não foram observadas alterações morfológicas significativas, tendo sido possível identificar os diferentes estratos que caracterizam uma epiderme diferenciada (Figura 4.9 A, B, C, D).

A avaliação da expressão dos diferentes marcadores epidérmicos foi também realizada com recurso à técnica de imunofluorescência. Na condição controlo e na epiderme exposta a 20 mJ/cm² de radiação UV-B verificou-se que a distribuição espacial da K14 se situava no *stratum basale* (Figura 4.9 E, G). No entanto, após a exposição a 10 e 30 mJ/cm² de radiação, a expressão deste marcador não se mostrou

limitada à camada mais interna, apresentando-se ao longo de toda a epiderme (Figura 4.9 F, H). A expressão da K10 foi observada no *stratum granulosum* e no *stratum corneum*, como esperado para uma epiderme diferenciada, ainda que com pouca intensidade (Figura 4.9 I, J, K, L). De igual forma, a expressão da INV fez-se notar nas camadas mais externas (Figura 4.9 M, N, O) com exceção da epiderme exposta a 30 mJ/cm² onde a INV parece também ter sido expressa pelas camadas mais internas (Figura 4.9 P). Relativamente aos marcadores de ativação celular, percebeu-se que a amostra controlo expressava K6 e que esta expressão se localizava sobretudo no *stratum spinosum* (Figura 4.9 Q). Nas epidermes estimuladas com radiação pareceu existir um aumento na intensidade da fluorescência deste marcador, com o aumento da dose de radiação UV-B aplicada (Figura 4.9 R, S, T). No caso das epidermes expostas a 10 e 20 mJ/cm² a expressão mostrou-se mais intensa nas camadas superiores, mas não se mostrou restrita às mesmas (Figura 4.9 R, S). Na epiderme exposta a 30 mJ/cm² a expressão deste marcador mostrou-se dispersa por toda a amostra, não estando reduzida a uma camada em particular (Figura 4.9 T). Na epiderme não irradiada não se verificou expressão de K17, como esperado para uma epiderme normal (Figura 4.9 U). No que respeita às epidermes irradiadas, parece ter havido um aumento de expressão com o aumento da intensidade da radiação UV-B, estando a K17 localizada por toda a epiderme (Figura 4.9 V, W, X). No entanto, é importante realçar que a espessura da epiderme exposta aos 30 mJ/cm² foi inferior à das restantes, o que pode ter enviesado os resultados obtidos pela imunofluorescência (Figura 4.8).

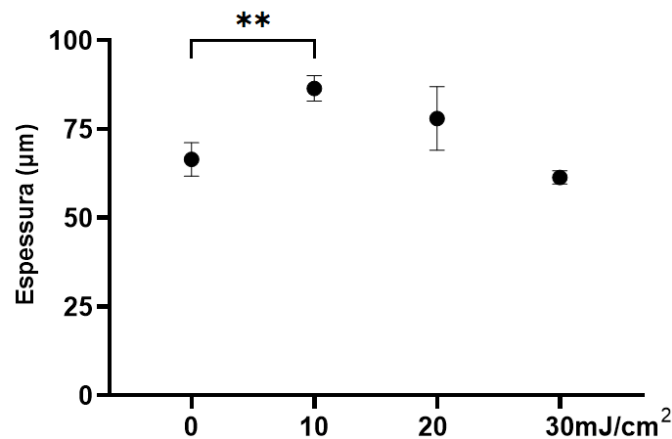


Figura 4. 8 Espessura média das epidermes 3D com HEKn, 96 horas após a exposição a diferentes intensidades de radiação UV-B. A epiderme submetida a 10 mJ/cm² apresentou um aumento estatisticamente significativo da sua espessura, face à condição controlo (0 mJ/cm²). A espessura apresentou uma tendência decrescente com o aumento da intensidade da radiação UV-B. Para a medição da espessura foi apenas considerado um ensaio experimental (n=1). O DV refere-se às três medições feitas por amostra. Os asteriscos (*) representam a significância estatística face à situação controlo. ** (p<0.01).

A análise da presença de citocinas no meio de cultura permitiu perceber que após a exposição à radiação UV-B, os níveis de IL-6 aumentaram com a intensidade da radiação, tendo este aumento sido estatisticamente significativo após a exposição a 30 mJ/cm², relativamente à situação controlo (Figura 4.10 A). Quanto à expressão da IL-1β, foi evidenciado um incremento nos seus níveis, sendo o maior aumento verificado nas epidermes expostas a 10 mJ/cm² (Figura 4.10 B).

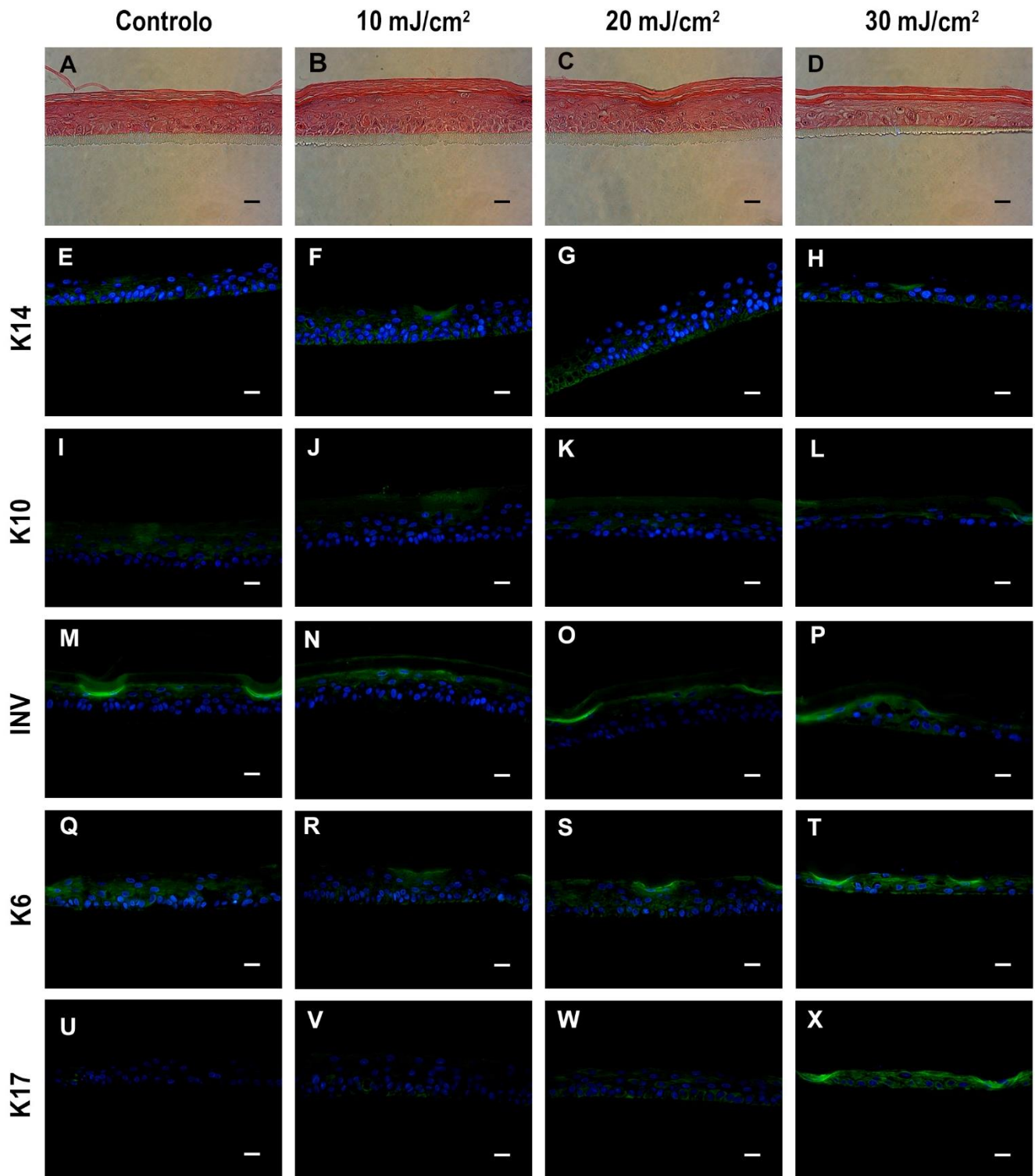


Figura 4. 9 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEKn, 96 horas após a exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm² de radiação UV-B. A análise morfológica -por marcação H&E- das epidermes com HEKn, 96 horas após exposição (B, C, D) e numa situação controlo (A) revela a organização estrutural dos HEKn nas diferentes camadas epidérmicas. A azul encontram-se representados os núcleos e a verde a K14, K10, INV, K6 e K17. Nas epidermes expostas à radiação UV-B observa-se um aumento na expressão a K6 e da K17 com o aumento da radiação. Para cada condição testada realizaram-se dois ensaios independentes (n=2). A barra da escala equivale a 25µm em todas as imagens.

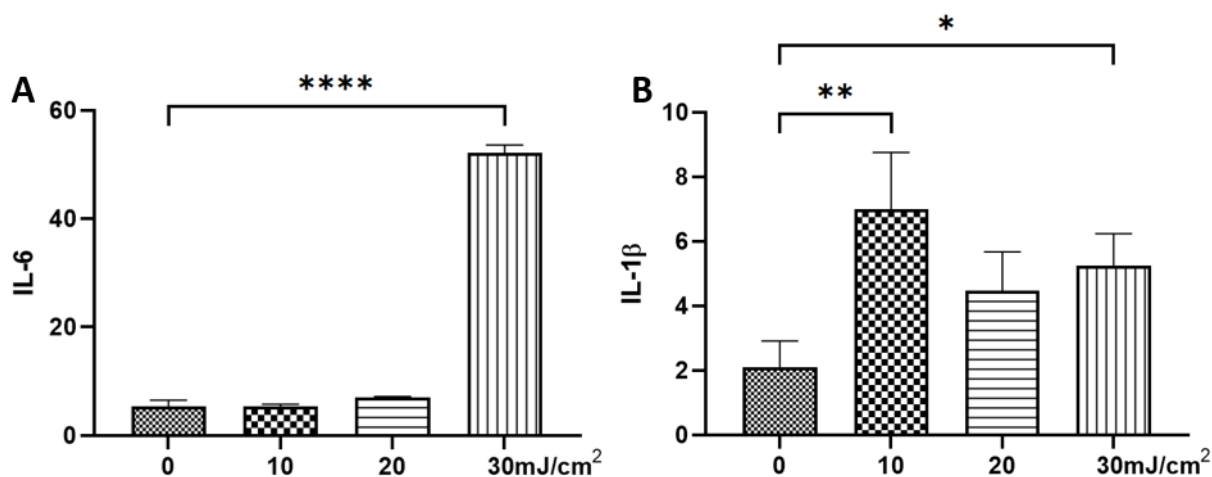


Figura 4.10 Níveis de citocinas secretadas pelos HEK_n, 96 horas após a exposição à radiação UV-B (0, 10, 20, 30 mJ/cm²). Os níveis de mediadores inflamatórios - IL-6 (A) e IL-1β (B) - libertados pelos HEK_n após estimulação com diferentes intensidades de radiação UV-B foram medidos através de ELISA a partir do meio de cultura. As barras mostram a média ± DP. Para cada condição foram realizadas três análises independentes (n=3). Os asteriscos (*) representam a significância estatística face à situação controlo (0 mJ/cm²). * (p≤0.05); ** (p≤0.01); **** (p≤0.0001).

4.1.3. Efeitos do TNF-α em modelos 3D epidérmicos com HEK_n, 24 horas após a sua aplicação

Outro dos objetivos deste projeto relacionou-se com a avaliação do desempenho do TNF-α, como iniciador dos processos inflamatórios nos queratinócitos. De forma semelhante ao executado para os ensaios com radiação UV-B, testaram-se várias doses de TNF-α, por forma a otimizar a concentração capaz de induzir uma resposta inflamatória no modelo 3D epidérmico. Simultaneamente, testaram-se também diferentes tempos de exposição do modelo à ação desta citocina pró-inflamatória. A análise histológica dos modelos tratados com 25, 50 e 100 ng/mL de TNF-α, durante 24 horas, não revelou alterações profundas na organização estrutural das epidermes, face à condição controlo. Contudo, foi possível perceber que existiu pouca proliferação celular, já que as epidermes apresentaram uma espessura inferior relativamente a ensaios anteriores (Figura 4.11) e, consequentemente, a estratificação foi também comprometida (Figura 4.12 A, B, C, D).

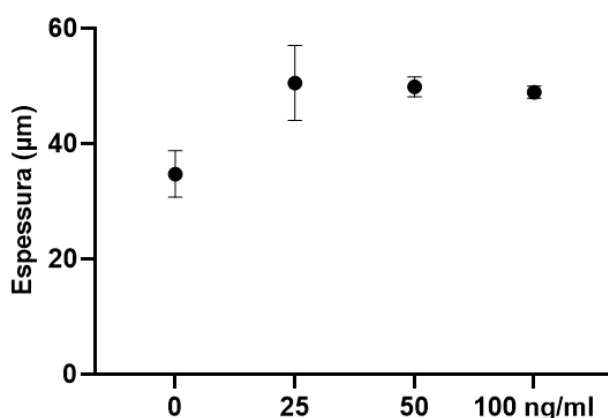


Figura 4.11 Espessura média das epidermes 3D com HEK_n, 24 horas após a exposição a diferentes concentrações de TNF-α. Os modelos epidérmicos 3D submetidos à ação do TNF-α não apresentaram espessuras significativamente diferentes do controlo mas, comparativamente a ensaios anteriores, a espessura destas amostras é inferior. Para cada condição foram realizados dois ensaios independentes (n=2). O DV refere-se às três medições feitas por amostra.

Tal como nos estudos com radiação UV-B utilizaram-se biomarcadores, tendo-se observado que a expressão da K14 não se mostrou intensa nem limitada à camada basal, tendo sido também identificada no *stratum spinosum* (Figura 4.12 E, F, G, H). A K10 foi expressa pelas camadas suprabasais da epiderme controlo e das epidermes tratadas com 25 e 100 ng/mL, ainda que de forma muito pouco intensa (Figura 4.12 I, J, L). Porém, na epiderme tratada com 50 ng/mL, não foi possível identificar a expressão deste marcador (Figura 4.12 K). De forma idêntica, a expressão da INV também não se mostrou intensa, estando particularmente ausente na epiderme tratada com 25 ng/mL (Figura 4.2 N). Nas restantes epidermes, apesar da fraca intensidade, foi possível identificar a expressão deste marcador no *stratum corneum* (Figura 4.12 M, O, P). A K6 foi expressa pela epiderme onde não foi aplicado TNF- α , tendo sido observada em toda a amostra (Figura 4.12 Q). Contudo, parece ter existido um aumento da expressão deste marcador com o aumento da concentração de TNF- α aplicada (Figura 4.12 R, S, T). De forma semelhante, a expressão da K17 também se mostrou mais intensa na epiderme submetida a 100 ng/mL (Figura 4.12 X), face à condição controlo (Figura 4.12 U) e às epidermes expostas a concentrações inferiores de TNF- α (Figura 4.12 V, W). A proliferação celular foi também avaliada com recurso ao marcador Ki-67. Os resultados mostram ter existido uma diminuição da atividade proliferativa dos queratinócitos do *stratum basale* com o aumento da concentração de TNF- α a que os modelos 3D foram expostos, comparativamente ao controlo (Figura 4.13).

O meio de cultura recolhido 24 horas após a aplicação do TNF- α foi analisado por ELISA, para quantificar a expressão de IL-6 e IL-1 β pelos queratinócitos. Os níveis de IL-6 tiveram um aumento após aplicação do TNF- α nas epidermes, tendo este sido estatisticamente significativo após o tratamento com 100 ng/ml (Figura 4.14 A). Relativamente à IL-1 β , os níveis de expressão pelos queratinócitos diminuíram com o aumento da concentração de TNF- α utilizada (Figura 4.14 B).

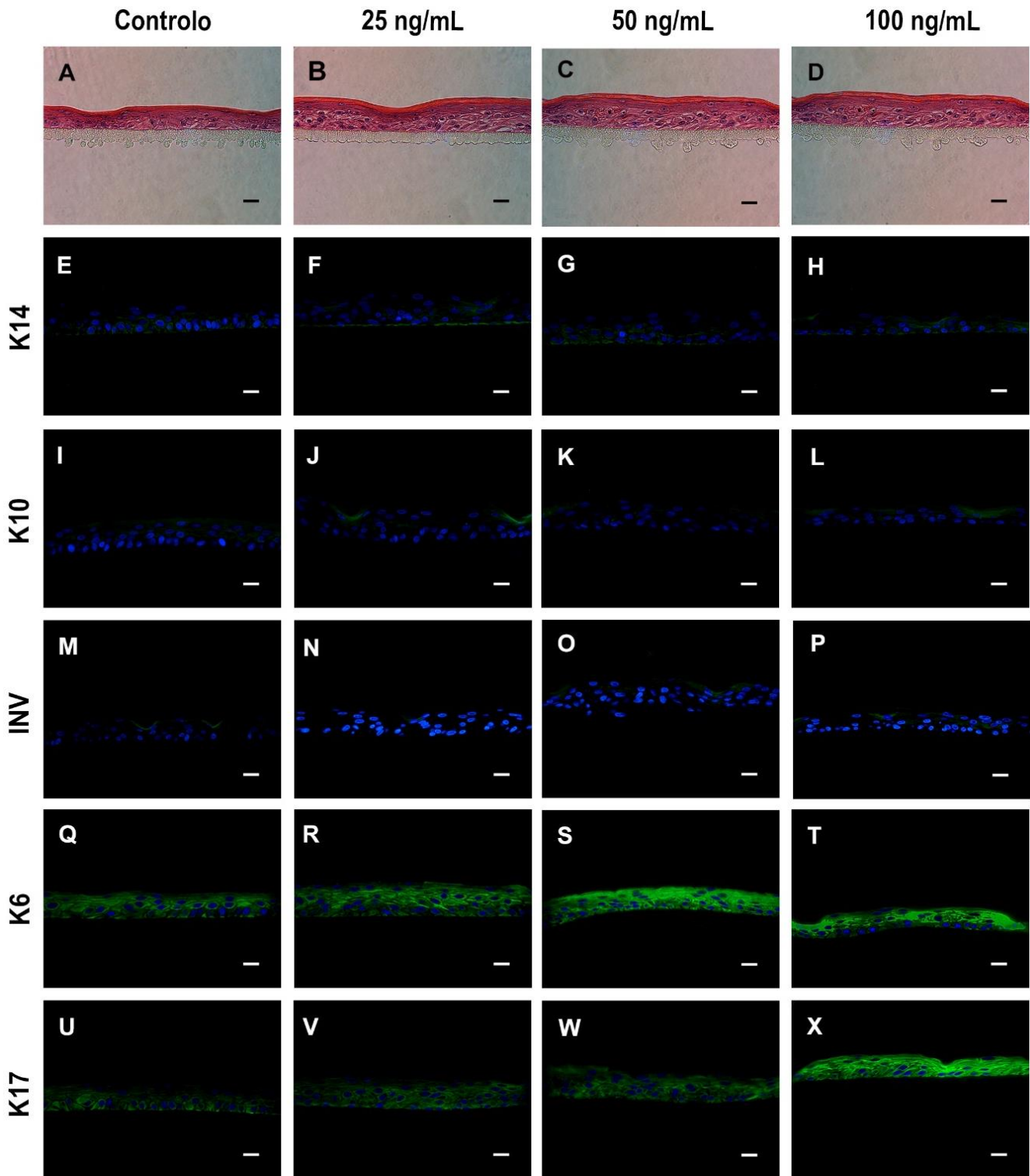


Figura 4. 12 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEKn, 24 horas após o tratamento com 25, 50 e 100 ng/mL de TNF- α . A morfologia das epidermes é visível através da marcação H&E (A-D). O DAPI marcou os núcleos das células a azul e a verde encontram-se os marcadores epidérmicos. A expressão da K6 e da K17 mostrou-se mais intensa nas epidermes tratadas com concentrações mais elevadas de TNF- α . Para cada condição testada realizaram-se dois ensaios independentes (n=2). A barra da escala equivale a 25 μ m em todas as imagens.

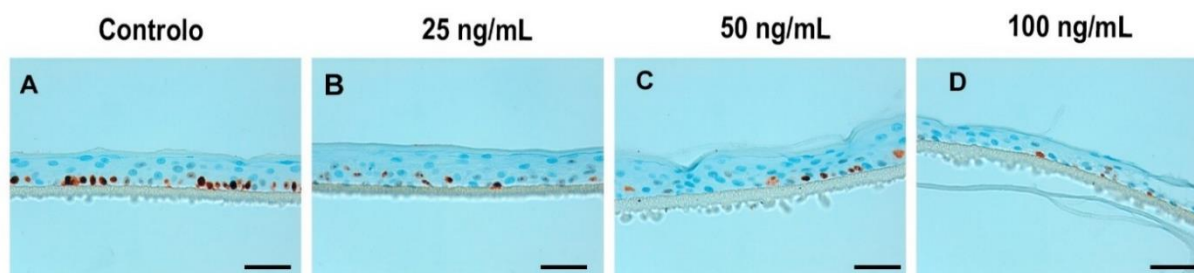


Figura 4.13 Proliferação celular dos modelos epidérmicos 3D com HEKs 24 horas após a estimulação com TNF- α . A marcação com Ki-67 mostra um decréscimo da atividade proliferativa das células do *stratum basale* com o aumento da concentração de TNF- α aplicada. A barra da escala equivale a 50 μ m em todas as imagens.

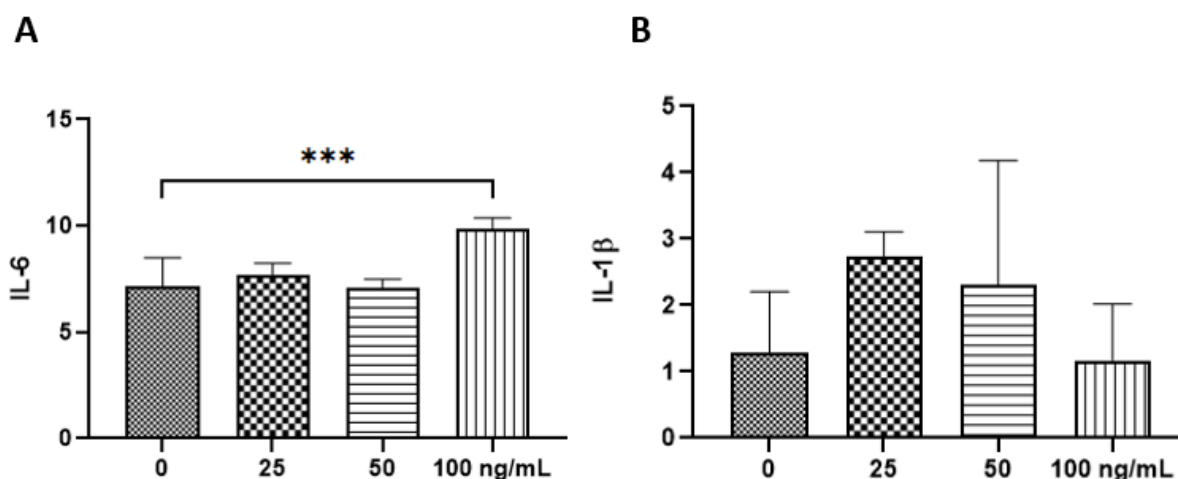


Figura 4.14 Níveis de citocinas secretadas pelos HEKs, 24 horas após a aplicação de concentrações crescentes de TNF- α (0, 25, 50 e 100 ng/mL). O meio de cultura dos ensaios epidérmicos foi analisado por ELISA, para quantificação das citocinas-IL-6 (A) e IL-1 β (B) - secretadas pelos HEKs após estimulação com TNF- α . As barras mostram a média \pm DP. Para cada condição foram realizadas três análises independentes (n=3). Os asteriscos (*) representam a significância estatística face à situação controlo (0 mJ/cm²). * (p \leq 0.05); ** (p \leq 0.01); **** (p \leq 0.0001).

4.1.4. Efeitos do TNF- α em modelos 3D epidérmicos com HEKs, 48 horas após a sua aplicação

Os efeitos do tratamento com TNF- α na morfologia e expressão de biomarcadores epidérmicos foram também avaliados ao fim de 48 horas de exposição. Apesar da existência de *stratum corneum*, indicativo da diferenciação dos queratinócitos, a marcação H&E revelou alguma desorganização celular, não sendo observável uma demarcação nítida dos queratinócitos basais face às camadas superiores, refletindo uma fraca estruturação do *stratum basale*. Além disto, é também notável alguma falta de compactação do tecido, devido à existência de alguns espaços livres entre células, sugerindo a existência de alterações durante o desenvolvimento das epidermes (Figura 4.15 A, B, C, D). Desta forma, a expressão dos biomarcadores epidérmicos foi também comprometida. A fluorescência associada à expressão da K14 foi bastante baixa (Figura 4.15 E, F, G, H), sendo apenas possível observar uma marcação muito ténue no *stratum basale* da epiderme tratada com 50 ng/ml de TNF- α (Figura 4.15 G). A K10 foi expressa pelo *stratum granulosum* e pelo *stratum corneum* mas não pela camada basal (Figura 4.15 I, J, K, L). A expressão da INV ocorreu na camada mais superficial da epiderme controlo (Figura 4.15 M) mas foi bastante fraca nas epidermes tratadas, não sendo perceptível (Figura 4.15 N, O, P). A expressão da K6 pôde ser identificada na epiderme controlo, ainda que com pouca intensidade (Figura 4.15 Q), e nas epidermes tratadas, apresentando maior intensidade na epiderme exposta a 100 ng/mL (Figura 4.15 R, S, T). A

expressão da K17 também se mostrou mais intensa à medida que a concentração de TNF- α aplicada aumentou (Figura 4.15 U, V, W, X).

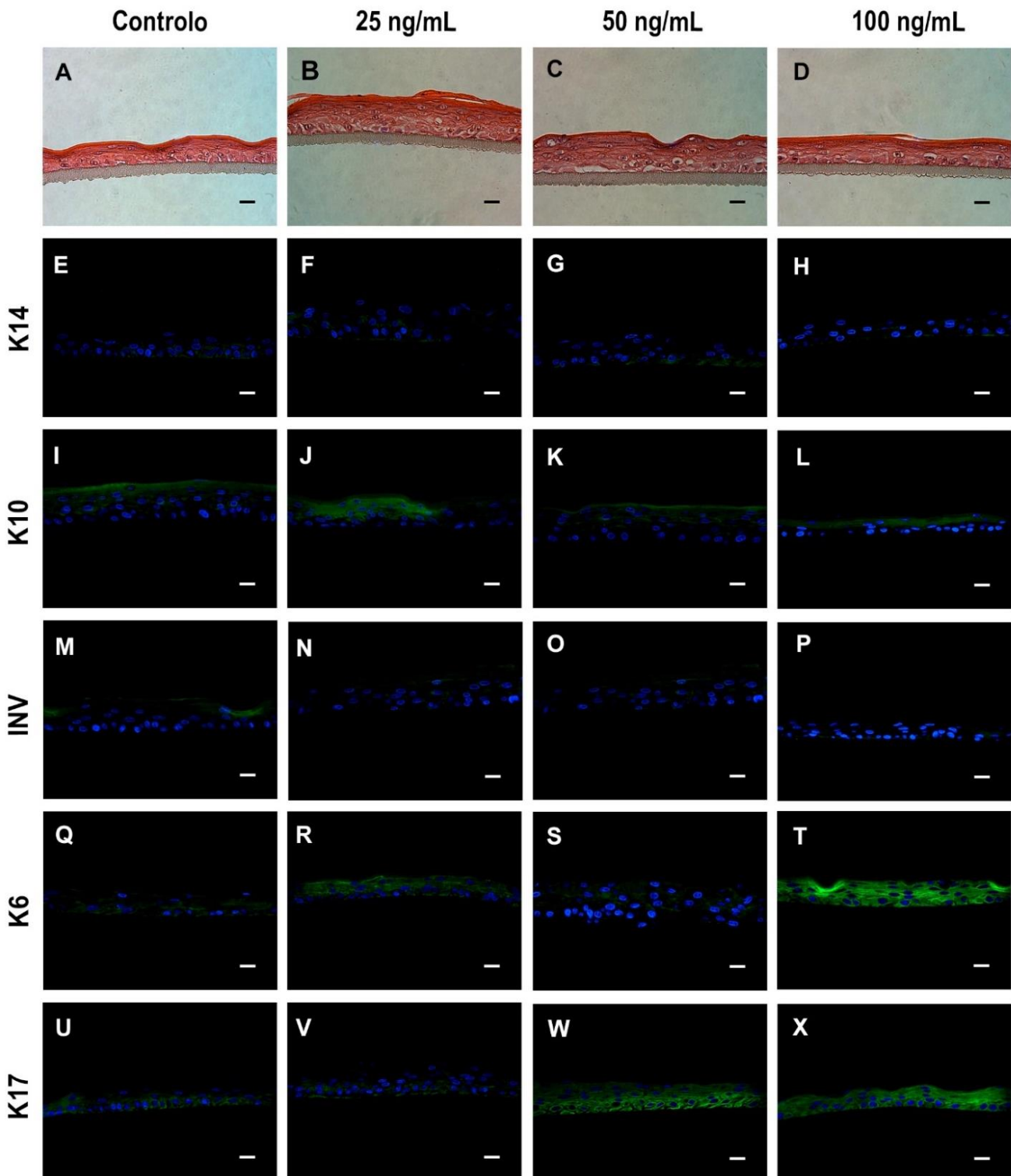


Figura 4. 15 Morfologia e expressão de marcadores epidérmicos no modelo de epiderme 3D com HEK_n, 48 horas após o tratamento com 25, 50 e 100 ng/mL de TNF- α . Análise histológica por H&E (A-D). A análise por imunofluorescência mostra os núcleos das células marcados pelo DAPI a azul e a K14, K10, INV, K6 e K17 a verde. A expressão da K6 foi mais intensa na epiderme tratada com 100 ng/mL de TNF- α e a K17 foi mais expressa após o tratamento com 50 e 100 ng/mL de TNF- α . Para cada condição foi apenas realizado um ensaio experimental (n=1). A barra da escala equivale a 25 μ m em todas as imagens.

Foi ainda estudado o efeito de concentrações mais elevadas de TNF- α , tendo-se verificado que os modelos tratados com 100 e 200 ng/mL apresentaram alterações morfológicas. Estas refletiram-se numa desorganização estrutural, que impossibilitou a identificação das diferentes camadas epidérmicas individuais, à exceção do *stratum corneum*, que apresentou um grande desenvolvimento. Além disso, foram também observadas lacunas entre as células, que contribuíram para o desarranjo do tecido, não permitindo realizar uma avaliação correta do efeito do TNF- α (Figura 4.16). Era também pretendido estudar o efeito da aplicação de 150 ng/mL, porém, a amostra correspondente não apresentou desenvolvimento, o que sugere a existência de distúrbios durante a formação das epidermes.

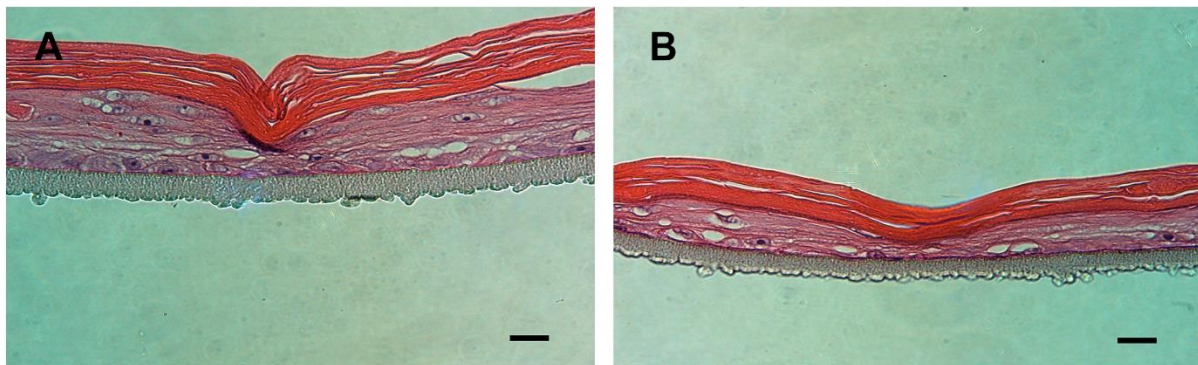


Figura 4. 16 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com HEK, por análise histológica, 48 horas após o tratamento com 100 e 200 ng/ml de TNF- α . A marcação H&E das amostras tratadas com 100 (A) e 200 ng/mL de TNF- α (B) evidencia a falta de coesão e de estruturação do tecido. O *stratum corneum* foi a única camada identificável em ambas as amostras. Para cada uma das condições foi apenas realizado um ensaio experimental (n=1). A barra da escala equivale a 25 μ m.

4.2. Modelo 3D epidérmico com queratinócitos da linha celular N/TERT-1

Seguindo a mesma linha de pensamento, pretendia-se comparar o potencial dos HEK com a linha celular N/TERT-1 para a construção de modelos epidérmicos que simulassem a inflamação, tendo-se seguido os protocolos experimentais descritos nas secções 3.3 e 3.4.

4.2.1. Efeitos da radiação UV-B, 48 horas após a exposição

Os modelos 3D foram expostos a 40, 50 e 60 mJ/cm² de radiação UV-B e, 48 horas após a exposição, não foi possível identificar camadas epidérmicas distintas nem células em diferenciação, sendo apenas identificável uma fina camada pouco coesa que se assemelhava ao *stratum corneum* (Figura 4.17). A amostra controlo foi a que mostrou ter uma estrutura mais compacta, sendo possível identificar mais células do que nas restantes amostras, apesar de não ter existido estratificação dos queratinócitos (Figura 4.17 A). Nas amostras submetidas à radiação UV-B não foi possível observar a estrutura característica de uma epiderme completamente diferenciada, existindo grande desintegração das mesmas (Figura 4.17 B, C, D).

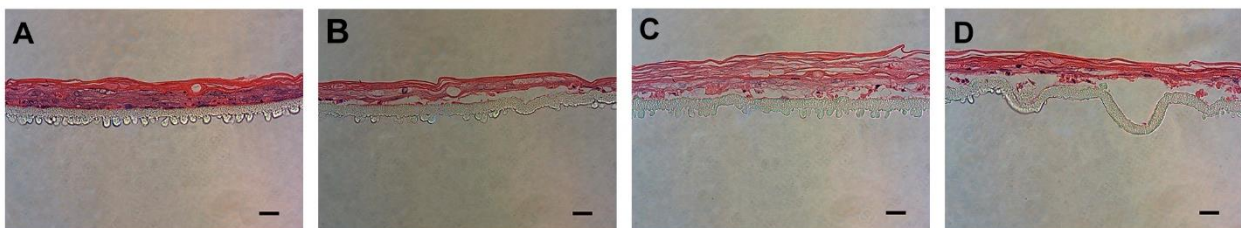


Figura 4. 17 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com N/TERT-1, por análise histológica, 48 horas após a exposição a 0, 40, 50 e 60 mJ/cm² de radiação UV-B. A marcação H&E mostra a ausência de estruturação e diferenciação dos queratinócitos N/TERT-1 numa situação controlo (A) e após a exposição a 40 (B), 50 (C) e 60 mJ/cm² (D). Imagens representativas de duas experiências independentes (n=2). A barra da escala equivale a 25 μ m.

4.2.2. Efeitos do TNF- α , 48 horas após a exposição

De forma similar, procurou-se avaliar o efeito do TNF- α nos modelos 3D de epiderme com queratinócitos N/TERT-1. Para isso, as amostras foram tratadas com 75, 100 e 120 ng/mL de TNF- α , durante 48 horas. Após esse período, foi possível identificar modificações no processo de estratificação e crescimento dos queratinócitos, sendo apenas evidente a existência de uma fina camada que, visualmente, se assemelhava ao *stratum corneum* (Figura 4.18 A, B, D). No caso particular da amostra tratada com 100 ng/mL de TNF- α , não foi possível identificar a presença de células e, conseqüentemente, qualquer indício de estratificação.

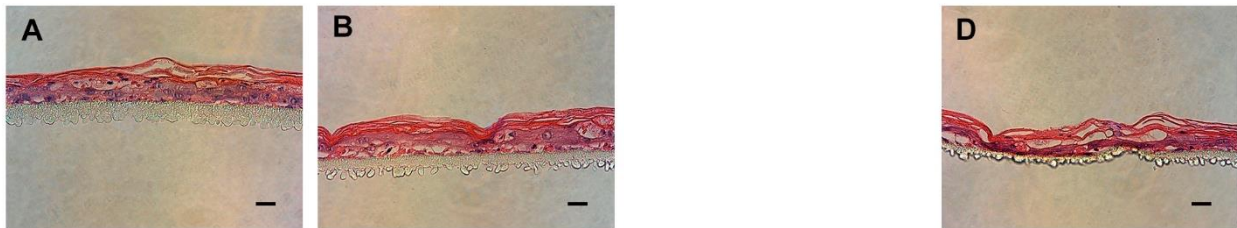


Figura 4. 18 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com N/TERT-1, por análise histológica, 48 horas após tratamento com 0, 75, 100 e 120 ng/mL de TNF- α . Imagens da marcação H&E, representativas de três experiências independentes (n=3) onde é evidenciada a ausência de proliferação e estruturação celular, numa situação controlo (A) e após tratamento com 75 (B), e 120 ng/mL (D). A amostra correspondente ao tratamento com 100 ng/mL não demonstrou sinais de desenvolvimento. A barra da escala equivale a 25 μ m.

4.2.3. Potenciais fatores que afetam o desenvolvimento e fisiologia dos modelos 3D epidérmicos *in vitro*

Diferentes fatores podem afetar o desenvolvimento dos modelos de RHE, bem como as respostas celulares face a estímulos externos (radiação UV-B, TNF- α). A diferenciação e estratificação dos queratinócitos reflete-se na espessura do tecido obtido, podendo esta variar em função de pequenas alterações na manipulação/disposição das células durante a cultura; da espessura e local do corte do micrótomo; do aporte dos fatores de crescimento; dos tempos de exposição à ALI; entre outros. Tendo isto em consideração, procurou-se perceber quais possíveis motivos para justificar a falta de diferenciação e estratificação celular evidenciada. Primeiramente, foram realizados cortes mais espessos (5 μ m), face à espessura normalmente utilizada (3 μ m) para identificar uma possível relação entre a espessura dos cortes histológicos e a integridade das amostras. Contudo, não foram verificadas alterações face à espessura regularmente utilizada, continuando a ser visível a falta de coesão e estratificação das amostras (dados não apresentados). A vitamina C foi também alvo de estudo, tendo sido utilizada uma solução feita imediatamente antes da sua utilização no ensaio. Neste caso, foi perceptível a existência de células, refletindo-se no aumento da espessura da amostra, que apresentou maior coesão face às amostras obtidas anteriormente com esta linha celular. Contudo, continuou a ser notória a fraca capacidade de estratificação dos queratinócitos, já que não foi possível distinguir as diferentes camadas epidérmicas, à exceção da camada mais externa (Figura 4.19 A). Foi ainda analisado o tempo de exposição à ALI, tendo este sido prolongado em 7 dias, perfazendo um total de 21 dias de exposição. De forma semelhante aos resultados previamente obtidos, foi perceptível que o aumento do tempo de exposição à ALI não se traduzia num aumento da proliferação e estratificação celular, não tendo sido possível identificar a estrutura típica de uma epiderme completamente diferenciada (Figura 4.19 B).

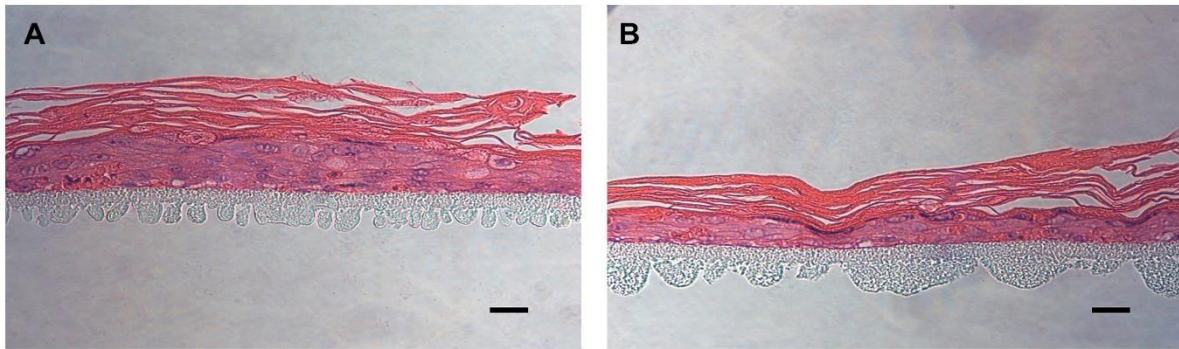


Figura 4. 19 Caracterização dos modelos epidérmicos 3D com N/TERT-1, por análise histológica, para estudo da influência da vitamina C (A) e do tempo de exposição à ALI (B). As imagens apresentadas mostram a marcação H&E das amostras. As células apresentaram desorganização estrutural e pouca proliferação, não existindo estratificação. Foi apenas possível distinguir a camada de *stratum corneum* como camada mais externa. A barra da escala equivale a 25 μ m.

5. Discussão

A pele é um órgão especializado que constitui uma barreira complexa e essencial para a manutenção da homeostase do corpo. É composta por duas camadas (derme e epiderme), que lhe conferem uma estrutura tridimensional dinâmica capaz de proteger o organismo da ação de estímulos externos potencialmente prejudiciais^{1,8}. Os queratinócitos são o principal tipo celular da epiderme, sendo fundamentais para a manutenção da integridade física e estrutural da pele. Contudo, nos últimos anos tem vindo a tornar-se cada vez mais evidente que as funções destas células não se limitam à formação da barreira epidérmica, tendo também um papel ativo na produção e expressão de moléculas efetoras³⁹. Desta forma, os queratinócitos são parte importante no que respeita à patogénese de diversas doenças inflamatórias de pele^{39,41}. Devido às restrições implementadas sobre o uso de seres vivos para fins académicos e industriais, a necessidade de desenvolver modelos 3D *in vitro* tem-se tornado cada vez mais evidente. Esta alternativa permite recriar, de forma aproximada, a arquitetura e função do tecido cutâneo nativo e, simultaneamente, permite atender às necessidades específicas de cada investigação. Por essa razão, os modelos 3D *in vitro* são considerados uma ferramenta valiosa para a modulação de doenças e para a avaliação da citotoxicidade de fármacos e produtos cosméticos⁵⁶. Assim sendo, este projeto teve como principal objetivo desenvolver e caracterizar um modelo 3D de epiderme humana, *in vitro*, que recriasse uma reação inflamatória local.

Neste projeto, foram utilizados dois tipos de células epidérmicas humanas para a construção dos modelos de RHE: HEK_n, isolados a partir de pele humana neonatal saudável; e queratinócitos da linha celular N/TERT-1, que consistem em queratinócitos imortalizados com o cDNA da hTERT⁶⁹. A capacidade de recapitular a arquitetura da epiderme humana *in vitro* é essencial para o sucesso dos modelos de RHE, existindo uma relação evidente entre a sua estrutura e função. Assim sendo, quanto maior for a semelhança estrutural dos modelos *in vitro* com os tecidos nativos, mais robustos estes modelos se tornam, permitindo aferir de forma mais precisa diversos fenómenos (ex. patofisiologias)¹. Tendo isto em mente, as células foram semeadas sobre membranas de policarbonato (*scaffold*), comercialmente disponíveis, e que oferecem um bom suporte para a sua proliferação, sem interferir com o comportamento das mesmas, devido à sua natureza inerte e biocompatibilidade⁶⁸. *In vivo*, as células existem num ambiente 3D onde conseguem ter acesso aos nutrientes que necessitam em todas as direções. Pelo contrário, quando são mantidas em *T-flasks*, são forçadas a crescerem numa superfície 2D, o que provoca alterações fisiológicas que vão afetar as suas funcionalidades e capacidade de diferenciação⁶². Por serem porosos, os *scaffolds* utilizados neste projeto permitem o acesso das células aos nutrientes, tanto pela superfície apical como pela superfície basolateral, promovendo um crescimento natural e multidimensional, contribuindo assim para o aumento da relevância biológica dos modelos⁶¹. O uso destes *scaffolds* é ainda vantajoso na medida em que dispensa a utilização de hidrogéis de origem animal, que muitas vezes são suscetíveis à contração física, tornando-se pouco estáveis^{62,68}. Aliado ao uso de *scaffolds* sintéticos, as células foram expostas à ALI de forma a facilitar o acesso ao oxigénio, e promover o seu crescimento e diferenciação⁶³.

A epiderme humana possui uma organização complexa em multicamada na qual os queratinócitos sofrem alterações conformacionais à medida que se diferenciam, perdendo a sua geometria colunar para adotarem um fenótipo achatado e queratinizado¹. Neste projeto, a organização em multicamada dos queratinócitos foi recapitulada com sucesso, *in vitro*, quando se utilizaram HEK_n (Figura 4.1 A), tendo sido possível identificar: o *stratum basale* onde as células estavam organizadas verticalmente de forma contígua e possuíam atividade proliferativa (evidenciada pela marcação com o anticorpo Ki-67 (Figura 4.1 B)); o *stratum spinosum*, onde os HEK_n adotaram uma conformação mais alongada; o *stratum granulosum*, e o *stratum corneum* (Figura 4.1 A). A presença de *stratum corneum* é sinónima do processo

de diferenciação terminal sofrido pelos queratinócitos, sendo determinante para a formação da barreira permeável da pele⁹². A maturação progressiva dos queratinócitos desde o *stratum basale* até ao *stratum corneum* é acompanhada pela expressão de diferentes proteínas, como a K14, a K10 e a INV. A função primária da K14 e da K10 é a de atuar como um suporte flexível e estável que, simultaneamente, permite às células epidérmicas resistir aos stresses mecânicos exteriores. A K14 é sintetizada pelos queratinócitos do *stratum basale*, sendo considerada um marcador de estratificação que permite confirmar o correto desenvolvimento e atividade proliferativa das células desta camada^{87,88}. Nas camadas suprabasais, a redução na expressão da K14, acompanhada do aumento na expressão da K10- sintetizada pelos queratinócitos pós-mitóticos- atuaram como um marcador de diferenciação celular^{15,17}. A INV é uma proteína expressa pelos queratinócitos das camadas superiores da epiderme, fazendo parte do envelope cornificado das células terminalmente diferenciadas⁸⁹. O padrão de expressão da K14, K10 e INV no modelo 3D epidérmico com HEK_n mostrou-se comparável ao verificado para a epiderme humana saudável e para outros modelos epidérmicos com HEK_n descritos na literatura (Figura 4.1 C, D, E)¹. Além de serem muito utilizadas como marcadores de proliferação e diferenciação celular, as queratinas são também uma ferramenta importante no diagnóstico de doenças epidérmicas¹⁵. A expressão da K6 e da K17 representa um estado ativado e hiperproliferativo dos queratinócitos pós mitóticos, o qual pode ser verificado em condições inflamatórias que estão na base de patologias cutâneas como a psoríase e dermatite atópica^{15,17}. Os padrões de expressão da K6 e da K17 no modelo 3D epidérmico com HEK_n sugerem que os queratinócitos se encontravam num estado ativado, tendo a expressão da K6 sido mais evidente (Figura 4.1 F, G). Contudo, tratando-se de uma condição controlo, esperava-se que os queratinócitos não expressassem estas queratinas, tal como sucede na epiderme interfolicular humana saudável, *in vivo*⁴⁰. Apesar disto, este resultado não é inédito, tendo sido verificada a expressão da K6 e da K17 ao longo de todas as camadas epidérmicas em substitutos de pele saudável num estudo desenvolvido por Smiley, A. *et al.*, 2006. Além disto, sabe-se que a suplementação com EGF durante a cultura *in vitro* tem efeito sobre a expressão da K6 pelos queratinócitos, induzindo-a⁹⁴. No decorrer deste projeto, o meio de cultura utilizado para o crescimento dos HEK_n não continha EGF na sua composição nem foi, posteriormente, suplementado com esta proteína. Ao invés disso, utilizou-se KGF para promover a diferenciação celular, pelo que se procurou perceber a possibilidade deste suplemento influenciar a expressão da K6 e da K17. De acordo com os estudos desenvolvidos por Gibbs, S. *et al.*, 2000 e Latkowski, J. *et al.*, 1995, o uso de KGF não altera a expressão destas queratinas, identificando-se um padrão de expressão semelhante ao verificado numa epiderme saudável, *in vivo*. Uma possível explicação para a diferença nos resultados obtidos pode relacionar-se com o tipo de queratinócitos utilizado, já que no modelo 3D epidérmico desenvolvido no decorrer deste projeto se utilizaram queratinócitos neonatais e Gibbs, S. *et al.*, 2000 e Latkowski, J. *et al.*, 1995 utilizaram queratinócitos adultos. Os queratinócitos neonatais diferem significativamente de queratinócitos provenientes de indivíduos mais velhos. Essas diferenças refletem-se ao nível do potencial proliferativo e de diferenciação, sendo evidenciadas através da expressão de queratinas diferentes⁹⁶. Apesar disto, é importante realçar que este padrão não foi verificado para todos os replicados (n=3), existindo uma grande variabilidade, sendo, por isso, importante aumentar o número de amostras.

Os modelos 3D epidérmicos com HEK_n foram expostos a intensidades crescentes de radiação UV-B, um potente indutor de inflamação cutânea⁹⁷, de modo a determinar a intensidade capaz de melhor simular uma reação inflamatória na epiderme. 48 horas após a exposição dos modelos ao intervalo de intensidades de radiação UV-B entre os 10 mJ/cm² (Figura 4.2 A, B, C) e os 60 mJ/cm² (Figura 4.4 A, B, C), não foram verificadas alterações a nível morfológico, tendo a integridade da amostra sido preservada. Além disto, apesar de se ter verificado um aumento significativo da espessura das amostras expostas a 40 e 50 mJ/cm², face ao controlo (Figura 4.5) não foi identificado um cenário de hiperqueratinose ou hiperplasia epidérmica, ambos indicativos da ação de intensidades excessivas da radiação UV-B nas células⁹¹. Isto

sugere que as células apresentaram maior capacidade proliferativa, acompanhada de uma correta estratificação, o que resultou no aumento da espessura das amostras. O padrão de expressão da K14 nas epidermes expostas a 10 e 20 mJ/cm² de radiação UV-B assemelha-se ao verificado para a epiderme saudável *in vivo* e em outros modelos com HEKn (Figura 4.2 D, E)¹. Todavia, nas epidermes expostas a 30, 40, 50 e 60 mJ/cm², a expressão deste marcador mostrou-se dispersa pelas várias camadas epidérmicas (Figura 4.2 F, Figura 4.4 D, E, F). Observações semelhantes foram verificadas por Horio, T. *et al.*, 1993 que, ao expor a pele de porquinhos da Índia à radiação UV, detetou a expressão de anticorpos específicos para queratinas da camada basal em camadas suprabasais. Um outro estudo realizado em pele humana, *in vivo*, revelou que a radiação UV-B induz um aumento na expressão de várias queratinas e que existiam inúmeros queratinócitos suprabasais a expressar K14⁹⁹. Desta forma, os resultados obtidos podem sugerir que: i) a radiação UV-B provoca indução da expressão da K14 nos queratinócitos suprabasais⁹⁹, ou ii) os queratinócitos basais migraram para as camadas superiores da epiderme, podendo isto estar relacionado com o estado hiperproliferativo em que se encontram após terem sido expostos à radiação UV-B⁹⁸. De facto, a marcação com o anticorpo Ki-67 refletiu um aumento da proliferação celular após a exposição à radiação (Figura 4.1 B, Figura 4.3). A expressão suprabasal da K10 e da INV foi verificada para todas as intensidades testadas, estando em concordância com o verificado noutros modelos com HEKn e na epiderme humana nativa (Figura 4.2 G-L, Figura 4.4 G-L)¹. Vários estudos mostram existir alterações no padrão de expressão das queratinas após a exposição à radiação UV^{98,99}. Em particular, foram dadas evidências do aumento da expressão da K6 em HEK após a exposição à radiação UV-B num estudo desenvolvido por Bernerd, F. *et al.*, 2001. Nesse sentido, pressupôs-se que a expressão da K6 nos modelos 3D aumentasse com o aumento da intensidade da radiação UV-B utilizada e que um padrão semelhante fosse observado para a K17, já que esta está intimamente associada a reações inflamatórias cutâneas⁸². Todavia, esta tendência não foi completamente verificada já que as amostras expostas a 20 mJ/cm² (Figura 4.2 N, Q) apresentaram maior intensidade na expressão de ambas as queratinas, face aos modelos expostos a 30 mJ/cm² (Figura 4.2 O, R). Apesar disto, foi notório um aumento na expressão após a exposição a intensidades mais elevadas, com as epidermes expostas a 60 mJ/cm² a apresentarem uma marcação mais intensa face às restantes (Figura 4.4 O, R). Mais uma vez, é de destacar que os resultados obtidos para os ensaios com 10, 20 e 30 mJ/cm² não apresentaram consistência entre replicados (n=3). Uma explicação provável pode relacionar-se com a variabilidade inerente à realização de ensaios independentes, tendo-se verificado a existência de alterações na proliferação e estratificação de algumas amostras, podendo isto ter impactado a expressão das queratinas em análise. Relativamente aos estudos com 40, 50, e 60 mJ/cm² parece ter existido um crescente na expressão da K6 e da K17. Contudo, apenas foi realizado um ensaio experimental para estas condições (n=1), pelo que será necessário aumentar a amostragem a fim de confirmar esta tendência. Adicionalmente, seria importante complementar a abordagem qualitativa obtida através dos ensaios de imunofluorescência com uma abordagem mais quantitativa, de modo a poder quantificar a expressão dos marcadores epidérmicos. Depois da exposição a 75 e 90 mJ/cm², a falta de coesão tecidual generalizada foi evidenciada pela ausência de estratificação, bem como pela presença de espaços livres entre as células e o *scaffold*, mas também dentro das próprias células (Figura 4.6). Apesar disto, a existência de uma fina camada de *stratum corneum*, sugere que os queratinócitos passaram pelo processo de diferenciação e que os danos observados foram, muito possivelmente, provocados *a posteriori*, aquando da irradiação. Desta forma, os resultados obtidos parecem indicar que estas intensidades são excessivas, não sendo as mais adequadas para estudar os processos inflamatórios cutâneos pretendidos, já que a integridade das amostras não foi preservada.

Os queratinócitos humanos apresentam-se como a principal fonte de citocinas da epiderme, expressando IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, entre outras³⁴. Neste projeto, 48 horas após a exposição à radiação UV-B, analisou-se o perfil de expressão da IL-6 e da IL-1 β , por serem duas das citocinas expressas pelos queratinócitos que melhor caracterizadas estão em termos da sua regulação e função nestas células, e por

desempenharem um papel fundamental na fase inicial da resposta inflamatória^{34,79}. A produção constitutiva destes mediadores, quer *in vivo* como *in vitro*, é reduzida, podendo ser aumentada por diversos estímulos, dos quais se destaca a radiação UV²⁹. Nos modelos 3D com HEKn foi verificado um aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão da IL-6 com a intensidade da radiação aplicada, a partir dos 50 mJ/cm², sugerindo que a intensidade ideal a aplicar nos modelos epidérmicos se poderá situar entre os 50 e os 90 mJ/cm² (Figura 4.7 A). Estes resultados estão em conformidade com vários estudos desenvolvidos previamente, onde foi identificada uma relação entre a intensidade de radiação UV-B aplicada e os níveis de citocinas libertados pelos queratinócitos^{100,101}. Porém, apesar do maior aumento nos níveis de IL-6 libertada ter sido verificado após a exposição a 90 mJ/cm², não se deve excluir a possibilidade de isso ocorrer devido a danos ou morte celular, já que foram verificadas grandes alterações morfológicas nas amostras após a estimulação com esta intensidade de radiação. Desta forma, em estudos futuros seria pertinente analisar o intervalo de intensidades entre os 50 e 70 mJ/cm² para perceber qual destas consegue provocar a libertação máxima de citocinas sem destruir a morfologia das amostras. Relativamente aos níveis de IL-1 β era esperado identificar uma relação de proporcionalidade direta com a intensidade da radiação UV-B utilizada^{101,102}. Contudo, os resultados obtidos não evidenciam uma relação clara entre estas variáveis, tendo-se identificado níveis mais elevados após a exposição a 20 e 30 mJ/cm² e também após a exposição aos 90 mJ/cm², à semelhança do verificado para a IL-6 (Figura 4.7 B), pelo que é importante repetir esta análise. Apesar disto, os níveis de IL-1 β após a exposição a 20 mJ/cm² podem, de certa forma, justificar a expressão da K6 evidenciada pelos ensaios de imunofluorescência (Figura 4.2 N), já que o papel da IL-1 na ativação dos queratinócitos através da indução da expressão desta queratina está descrito na literatura⁴⁰. Em estudos futuros seria interessante quantificar os níveis de expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) das citocinas de interesse. Esta abordagem permitirá aferir de que forma a expressão génica varia com a intensidade da radiação utilizada e, simultaneamente, permitirá fazer uma interpretação mais completa dos dados obtidos pelos ELISAs, já que, devido ao consumo celular de citocinas, os níveis reais podem ser subestimados¹⁰³.

Para avaliar se a resposta à radiação UV-B se mantinha passado algum tempo, os modelos foram analisados 96 horas após a exposição a 10, 20 e 30 mJ/cm². No que respeita à expressão dos marcadores epidérmicos, a K14 mostrou-se limitada ao *stratum basale* na amostra controlo. Porém, nas amostras expostas à radiação verificou-se um padrão mais disperso, à semelhança do que foi observado nos ensaios analisados 48 horas após a exposição (Figura 4.9 E, F, G, H). A expressão da K10 revelou-se pouco intensa nas epidermes irradiadas, o que poderia refletir a influencia da radiação UV-B, já que perante estímulos hiperproliferativos a expressão desta queratina é reduzida (Figura 4.9 I, J, K, L)¹⁰⁴. Todavia, também não foi verificada expressão na epiderme controlo o que pode sugerir que os HEKn suprabasais não se encontravam totalmente diferenciados. A INV foi expressa pelo *stratum granulosum* e pelo *stratum corneum*, em todas as condições, indicando a formação do envelope cornificado característico das células suprabasais (Figura 4.9 M, N, O, P)^{89,90}. O padrão de expressão da K6 e da K17 parece sugerir um aumento na expressão de ambas com a radiação UV-B (Figura 4.9 R, S, T, V, W, X). Apesar disto, a amostra controlo exibiu expressão de K6, pelo que é sensato considerar a hipótese de a expressão apresentada pelas epidermes irradiadas não ser exclusivamente devida à ação da radiação UV-B (Figura 4.9 Q). A espessura das amostras diminuiu com a intensidade da radiação (Figura 4.8). Contudo, é difícil afirmar a existência de uma relação com a exposição à radiação UV-B uma vez que, normalmente, há um aumento da espessura da epiderme devido à hiperproliferação celular causada por essa exposição⁹¹. Assim sendo, o mais plausível é que as amostras apresentem um baixo grau de estratificação, possivelmente devido a desregulações na proliferação dos HEKn durante a formação da epiderme.

O perfil cinético da expressão de IL-6 mostrou existir um aumento progressivo nos níveis libertados pelos HEKn com o aumento da intensidade da radiação UV-B aplicada (10, 20 e 30 mJ/cm²), 96 horas

após a exposição (Figura 4.10 A). Estes resultados vão de encontro ao verificado por de Vos, S. *et al.*, 1994, num estudo em que se conclui que a radiação UV-B induz a libertação da IL-6 pelos queratinócitos humanos de forma dependente da intensidade da radiação e do tempo de exposição. Também os níveis de IL-1 β se mantiveram elevados, relativamente à situação controlo (Figura 4.10 B). Estes resultados confirmam que a atividade inflamatória dos HEK_n aumenta em resposta à radiação UV-B e que esta resposta se prolonga no tempo, à semelhança do que foi verificado em estudos anteriores¹⁰¹. No futuro, seria conveniente aumentar o número de replicados para confirmar a tendência observada. Adicionalmente, seria relevante avaliar a libertação destas citocinas pouco tempo após a exposição à radiação UV-B, já que existem evidências do aumento nos níveis de ambas as citocinas aqui estudadas, 12 horas após a irradiação dos queratinócitos¹⁰¹. Desta forma, seria possível realizar uma análise mais completa do perfil de expressão da IL-6 e da IL-1 β , tendo mais tempos de amostragem para analisar a que altura se dá a libertação máxima destas citocinas.

O TNF- α induz a transcrição de genes reguladores da inflamação, da sobrevivência, da proliferação e da diferenciação celular, através da ativação da via de sinalização do fator nuclear - κ B (NF- κ B)¹⁰⁶. Para ambos os tempos de exposição testados foi verificado um padrão de expressão de queratinas semelhante (Figura 4.12, Figura 4.15). A expressão da K14, K10 e INV mostrou-se bastante fraca em todas as condições testadas, incluindo nas amostras controlo (Figura 4.12 E-P, Figura 4.15 E-P). Tendo este padrão sido observado nas amostras controlo, e existindo evidências de que o TNF- α não tem efeito global sobre as proteínas epidérmicas¹⁰⁷, não parece provável que a ausência de marcação verificada tenha sido induzida pelo tratamento com esta citocina. Estes resultados, juntamente com a análise histológica (Figura 4.12 A-D, Figura 4.15 A-D) e com as medições da espessura das amostras (Figura 4.11), evidenciam um baixo grau de proliferação celular que, por sua vez, parece ter comprometido a estratificação das células nas diferentes camadas epidérmicas. Assim, é importante ter em conta que a fraca estratificação dos modelos 3D epidérmicos pode interferir com a interpretação dos resultados sobre a expressão das queratinas e dos níveis de citocinas. Apesar disto, foi possível identificar um aumento na expressão da K6 e da K17 com o aumento da concentração de TNF- α , em ambos os tempos de exposição (Figura 4.12 Q-X, Figura 4.15 Q-X), estando estas observações em consonância com publicações anteriores^{107,108}. Adicionalmente, sabe-se que o TNF- α afeta o ciclo celular dos queratinócitos, suprimindo a expressão de proteínas associadas à proliferação celular⁵¹. Neste projeto, foi observada uma redução na proliferação dos queratinócitos basais dos modelos tratados com TNF- α , face à condição controlo, reiterando assim o efeito inibitório desta citocina (Figura 4.13).

O TNF- α foi capaz de provocar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-6 24 horas após o tratamento com 100 ng/mL (Figura 4.14 A). Por outro lado, os níveis de IL-1 β mostraram diminuir com a concentração de TNF- α (Figura 4.14 B). Estudos realizados em modelos 2D com queratinócitos da linha celular HacaT verificaram um aumento na expressão génica e proteica de ambas as citocinas aqui estudadas quando se adicionaram 10¹⁰⁹ e 20¹¹⁰ ng/mL de TNF- α ao meio de cultura. Contudo, ao nosso conhecimento não foi ainda testado o efeito de concentrações crescentes de TNF- α em modelos 3D exclusivamente epidérmicos, com HEK_n. Sob determinadas circunstâncias, a IL-1 é mitogénica para os queratinócitos, isto é, estimula a proliferação celular, o que implica que estes expressem recetores membranares para esta citocina, tendo sido verificada a existência de quantidades significativas destes recetores, *in vitro*. A capacidade de uma célula que produz uma determinada citocina expressar recetores para essa mesma citocina sugere que esta desempenha um papel autócrino na ativação da célula¹¹¹. Esta situação pode ser observada nos queratinócitos, já que estes expressam IL-1 e possuem recetores membranares para a mesma. Desta forma, pode ser especulado que a redução nos níveis de IL-1 β após a aplicação do TNF- α se possa dever à ação autócrina desta citocina, já que não existem componentes

dérmicos nem imunitários capazes de receber a sinalização parácrina dos queratinócitos lesados. Além disto, outra hipótese é que a maioria da IL-1, *in vitro*, permaneça associada à membrana celular ou no domínio intracelular, podendo isso influenciar a quantidade libertada para o meio de cultura¹¹¹. Desta forma, reiterando ideias anteriores, seria benéfico aumentar o número de replicados e complementar a análise da expressão proteica com a quantificação da expressão génica destas citocinas. Nas epidermes 3D tratadas com concentrações de TNF- α mais elevadas (100, 150 e 200 ng/mL), a análise não pôde ser concluída, já que ocorreram alterações morfológicas significativas nas amostras, nomeadamente, ausência de proliferação celular, organização estrutural e estratificação em camadas epidérmicas individuais (Figura 4.16). Além disto, foram observados espaços livres no interior das amostras, o que contribuiu para o desarranjo tecidual evidenciado. Este padrão foi observado em todas as condições, incluindo na amostra controlo (dados não apresentados), o que sugere que o fenótipo verificado muito possivelmente se deve a desregulações ocorridas nas próprias células e não ao efeito do TNF- α nas mesmas. Não tendo sido possível aumentar o número de replicados no tempo útil para a realização deste projeto, futuramente, seria importante replicar as condições testadas por forma a otimizar a concentração ideal de TNF- α a usar no modelo.

Apesar de não tão utilizada quanto os queratinócitos primários, a linha celular N/TERT-1 provou ser igualmente apropriada para desenvolver modelos de RHE e RHS, já que os queratinócitos imortalizados apresentam uma capacidade de proliferação e diferenciação, bem como uma funcionalidade de barreira semelhante à verificada em modelos com células primárias^{56,71}. Adicionalmente, as respostas inflamatórias dadas pelos queratinócitos imortalizados são também equiparadas às observadas em queratinócitos primários, podendo ser utilizadas com sucesso na construção de modelos de doenças inflamatórias cutâneas, *in vitro*⁷¹. Por estas razões, neste projeto foi testado o uso desta linha celular para o desenvolvimento do modelo epidérmico 3D pretendido. Em todos os ensaios realizados com queratinócitos N/TERT-1 verificou-se um padrão comum, marcado pela ausência de proliferação e diferenciação celular, não tendo sido identificados sinais de estratificação. Ao invés disso, foi perceptível que as amostras apresentavam um elevado grau de desintegração devido à presença de espaços livres (Figura 4.17, Figura 4.18). Tendo em consideração que este fenótipo foi observado tanto nas amostras controlo como nas amostras expostas à radiação UV-B e ao TNF- α , pode depreender-se que não foi um resultado direto dessa exposição. Posto isto, foram colocadas e testadas várias hipóteses para o sucedido. Em primeiro lugar, analisou-se a possibilidade de a desintegração das amostras poder ser devida ao corte com o micrótopo, aquando da análise histológica. Por essa razão, foram comparados cortes com 3 μ m e 5 μ m de espessura, não tendo sido observadas melhorias significativas na integridade das amostras, o que exclui este fator como causador do fenótipo observado. Na sua forma liofilizada, a vitamina C é relativamente estável, mas quando dissolvida em água apresenta uma taxa de decomposição elevada, tornando-se mais instável¹¹². Desta forma, foi utilizada uma nova solução aquosa, feita imediatamente antes da sua junção ao meio de cultura, para garantir a maior estabilidade possível e poder avaliar a influência da vitamina C no desenvolvimento dos modelos 3D epidérmicos. Apesar de ter sido notório um desenvolvimento ao nível do *stratum corneum*, não foi possível identificar com clareza as restantes camadas epidérmicas, o que sugere que a solução de vitamina C previamente utilizada nos ensaios não foi uma condicionante para a estratificação dos queratinócitos N/TERT-1 (Figura 4.19 A). Sabendo que a ALI é essencial para a obtenção da morfologia epidérmica normal e para a função de barreira⁶³, ponderou-se se um aumento no tempo de exposição das células (total de 21 dias) poderia ser necessário. Contudo, não foram identificados sinais de uma organização estrutural em multicamada, à exceção da camada mais externa, indicando que o tempo de exposição à ALI até então utilizado nos ensaios (14 dias) não era a causa da falta de proliferação e diferenciação evidenciada pelos queratinócitos N/TERT-1 (Figura 4.19 B).

A composição do meio de cultura, os suplementos utilizados, a atmosfera gasosa, a temperatura, o pH e a matriz sobre a qual as células crescem são fundamentais para o sucesso das culturas celulares *in vitro*. Alterações em qualquer um destes parâmetros podem ter efeitos significativos sobre o fenótipo, crescimento e viabilidade celular¹¹³, pelo que não deve ser descartada a possibilidade de ter existido um desequilíbrio em algum destes fatores causando *stress* adicional sobre as células. Em particular, a adesão à superfície dos *inserts* de cultura celular pode ter sido um fator determinante, já que muitas vezes durante a cultura 2D as células proliferaram até atingirem a confluência desejada, sem evidência de elevados níveis de morte celular, mas ao serem semeadas acabavam por degenerar. No caso particular dos queratinócitos N/TERT-1, para potenciar a sua adesão, a membrana de policarbonato do *insert* foi revestida com colagénio tipo I, conhecido por promover a adesão, crescimento e diferenciação de vários tipos celulares⁵⁴. Apesar disto, não foi possível identificar sinais de proliferação ou diferenciação, o que pode sugerir a existência de alterações nas propriedades do colagénio, que podem ter comprometido a adesão das células, impedindo que estas estratificassem. No futuro, poderia ser interessante testar outro lote de colagénio tipo I e, no caso de continuarem a ser observados os mesmos problemas, poderia ser considerada a utilização de outras biomoléculas (ex. outros tipos de colagénio, gelatina, laminina)⁵⁴. Além disto, poderia também testar-se o aumento da concentração celular a semear, por forma a garantir que as células cobrem toda a superfície da membrana de policarbonato, impedindo a infiltração de meio de cultura no interior dos *inserts*. Esta situação, bastante recorrente no decorrer deste projeto, impossibilita o estabelecimento da ALI e, conseqüentemente, a estratificação dos queratinócitos, inviabilizando o ensaio experimental. Por fim, em ensaios futuros seria vantajoso utilizar novos lotes de HEK293 e N/TERT-1, para descartar a existência de problemas inerentes ao material biológico até então utilizado, e estabelecer novos *stocks* criopreservados de células (“*master cell banks*”) para, posteriormente, serem expandidos e utilizados (“*working cell banks*”)¹¹³.

6. Conclusão

Neste trabalho foram usados dois tipos de queratinócitos humanos para o desenvolvimento de modelos 3D epidérmicos *in vitro*, nomeadamente, HEK_n e queratinócitos da linha celular N/TERT-1. Para o estabelecimento dos modelos foi utilizada uma matriz de policarbonato, inerte e comercialmente disponível, que fornece um suporte adequado para a proliferação celular, reduzindo o tempo de produção dos modelos. A radiação UV-B e o TNF- α foram utilizados para estudar o seu potencial na indução de uma resposta inflamatória por parte dos queratinócitos. De forma a perceber a evolução da resposta inflamatória desencadeada pelos queratinócitos, o tempo pós-exposição foi também analisado.

Nos modelos controlo desenvolvidos com HEK_n foi possível mimetizar a morfologia epidérmica normal, identificando todas as camadas e tendo padrões de expressão de marcadores característicos do correto desenvolvimento epidérmico (K14, K10 e INV) comparáveis ao verificado *in vivo* e noutros estudos *in vitro*.

Os estudos desenvolvidos no decorrer deste projeto parecem confirmar a ideia de que a atividade inflamatória dos HEK_n aumenta em resposta à radiação UV-B, através do aumento da proliferação das células basais, da expressão da K6 e da K17 e da libertação da IL-6 e da IL-1 β . Adicionalmente, foi também confirmado que esta resposta se prolonga no tempo, já que 96 horas após a exposição à radiação UV-B, ainda foi possível identificar aumentos nos níveis de citocinas face à situação controlo. As intensidades de 75 e 90 mJ/cm² mostraram ser nocivas para as células, provocando alterações profundas nas amostras. Desta forma, a intensidade ideal a utilizar poderá situar-se entre os 50 e os 70 mJ/cm².

Nos ensaios com TNF- α não foi possível otimizar a concentração ideal a ser utilizada para provocar inflamação nos modelos epidérmicos, não tendo sido observada uma relação de proporcionalidade direta entre a concentração desta citocina e os níveis de libertação de IL-6 e IL-1 β . Contudo, o TNF- α parece ter induzido a expressão da K6 e da K17 de forma dependente da concentração utilizada, independentemente do tempo pós-exposição.

Com a linha celular N/TERT-1, a proliferação, diferenciação e estratificação celular foram afetadas, não tendo sido possível obter modelos 3D epidérmicos representativos. Foi analisada a influência da espessura dos cortes histológicos, da vitamina C e do tempo de exposição à ALI, tendo-se concluído que nenhum destes fatores afetou diretamente o fenótipo observado.

É importante sublinhar que os resultados obtidos no decorrer deste trabalho são individuais, tendo-se verificado uma grande variabilidade entre amostras. Durante este projeto surgiram imprevistos associados à cultura celular, o que dificultou em muito a obtenção de modelos 3D epidérmicos corretamente desenvolvidos. Em particular, a variabilidade associada às células primárias comerciais utilizadas constituiu um grande obstáculo, tendo sido testados vários lotes que não apresentavam a viabilidade necessária para a obtenção de resultados satisfatórios, no decorrer deste projeto de Mestrado. Sendo os modelos o ponto de partida para as análises subsequentes, e não tendo sido atingida a qualidade necessária dos mesmos, foi imposta uma grande condicionante sobre os estudos posteriormente desenvolvidos e, consequentemente, sobre os resultados obtidos. Em adição a isto, os constrangimentos logísticos feitos sentir durante a situação pandémica (ex. atrasos na entrega de meios de cultura, células e material descartável) limitaram a realização de mais ensaios experimentais, não tendo sido possível obter um número de replicados suficiente para todas as condições em estudo. Desta forma, no futuro seria importante completar as análises aqui descritas e repetir os estudos com HEK_n e queratinócitos N/TERT-1, utilizando novos lotes de células funcionais. Para completar estes estudos seria igualmente relevante

quantificar a expressão dos marcadores epidérmicos e analisar os níveis de expressão do mRNA das citocinas utilizadas.

Uma vez otimizadas as intensidades de radiação UV-B e a concentração de TNF- α , os modelos de epiderme inflamada poderão ser utilizados em estudos de avaliação de fármacos anti-inflamatórios. A inclusão de componentes dérmicos e, numa fase mais avançada, de componentes do sistema imunitário (ex. perfusão do plasma sanguíneo de um paciente) representa uma mais-valia para a valorização dos modelos, já que seria possível obter uma aproximação maior às condições *in vivo*. Em última instância, estes modelos 3D poderão vir a ser utilizados como uma ferramenta de medicina personalizada, na qual o microambiente do paciente pode ser recriado através da utilização das suas próprias células para a construção do modelo, permitindo perceber de que forma o fármaco em estudo se comporta.

7. Referências Bibliográficas

1. Roger, M., Fullard, N., Costello, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., Darling, N., Ritchie, P., Määttä, A., Karakesisoglou, I., Nelson, G., von Zglinicki, T., Dicolandrea, T., Isfort, R., Bascom, C. & Przyborski, S. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J. Anat.* 234, 438-455 (2019).
2. Lanigan, S. & Zaidi, Z. *Dermatology in Clinical Practice*. 1-15 (Springer-Verlag London, 2010).
3. Ng, K. & Lau, W. in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (ed. Dragicevic, N. & Maibach, H.) 1-9 (Springer, 2015).
4. Monteiro-Riviere, N. in *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology* (ed. Hobson, D.) 1-20 (CRC Taylor & Francis, 2006).
5. Junqueira, L. & Carneiro, J. *Histologia Básica*. 355-359 (Guanabara Koogan, 2013).
6. Proksch, E. pH in nature, humans and skin. *J. Dermatol.* 45, 1044-1052 (2018).
7. Tortora, G. & Nielsen, M. *Princípios de anatomia humana*. 134-141 (Grupo Gen - Guanabara Koogan, 2000).
8. Losquadro, W. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* 25, 283-289 (2017).
9. Hohl, D. Cornified Cell Envelope. *Dermatologica* 180, 201-211 (1990).
10. Menon, G., Grayson, S. & Elias, P. Ionic Calcium Reservoirs in Mammalian Epidermis: Ultrastructural Localization by Ion-Capture Cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.* 84, 508-512 (1985).
11. Nguyen, V., Ndoye, A., Hall, L., Zia, S., Arredondo, J., Chernyavsky, A., Kist, D., Zelickson, B., Lawry, M. & Grando, S. Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J. Cell Sci.* 114, 1189-1204 (2001).
12. Cooper, G. *The cell: A Molecular Approach*. (Sinauer Associates, 2000).
13. Lowery, J., Kuczmariski, E., Herrmann, H. & Goldman, R. Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. *J. Biol. Chem.* 290, 17145-17153 (2015).
14. Etienne-Manneville, S. Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 1-28 (2018).
15. Komine, M. in *Keratin* (ed. Blumenberg, M.) 12-22 (IntechOpen, 2018).
16. Yoon, S. & Leube, R. Keratin intermediate filaments: intermediaries of epithelial cell migration. *Essays Biochem.* 63, 521-533 (2019).
17. Zhang, X., Yin, M. & Zhang, L. Keratin 6, 16 and 17—Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells* 8, 807 (2019).
18. Lin, T., Zhong, L. & Santiago, J. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 70 (2017).
19. de Jager, T., Cockrell, A. & Du Plessis, S. in *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* (ed. Ahmad, S.) 15-23 (Springer, Cham, 2017).
20. Passeron, T., Krutmann, J., Andersen, M., Katta, R. & Zouboulis, C. Clinical and biological impact of the exposome on the skin. *JEADV* 34, 4-25 (2020).
21. Emri, G., Paragh, G., Tószaki, Á., Janka, E., Kollár, S., Hegedűs, C., Gellén, E., Horkay, I., Koncz, G. & Remenyik, É. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. *J. Photochem. Photobiol. B.* 185, 169-175 (2018).
22. Hart, P., Norval, M., Byrne, S. & Rhodes, L. Exposure to Ultraviolet Radiation in the Modulation of Human Diseases. *Ann. Rev. Pathol.* 14, 55-81 (2019).
23. McDaniel, D., Farris, P. & Valacchi, G. Atmospheric skin aging—Contributors and inhibitors. *J. Cosmet. Dermatol.* 17, 124-137 (2018).
24. Szilágyi, Z., Németh, Z., Bakos, J., Necz, P., Sáfár, A., Kubinyi, G., Selmaoui, B. & Thuróczy, G. Evaluation of Inflammation by Cytokine Production Following Combined Exposure to Ultraviolet

- and Radiofrequency Radiation of Mobile Phones on 3D Reconstructed Human Skin In Vitro. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 4401 (2020).
25. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X. & Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204-7218 (2017).
 26. Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S. & Masumoto, J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm. Regen.* 39, (2019).
 27. Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunobiology, 5th edition: The Immune System in Health and Disease*. (Garland Science, 2001).
 28. Kondo, S. The Roles of Keratinocyte-Derived Cytokines in the Epidermis and Their Possible Responses to UVA-Irradiation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 4, 177-183 (1999).
 29. Schwarz, T. & Luger, T. Effect of UV Irradiation on Epidermal Cell Cytokine Production. *J. Photochem. Photobiol. B.* 4, 1-13 (1989).
 30. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435 (2008).
 31. Fullerton, J. & Gilroy, D. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 551-567 (2016).
 32. Juráňová, J., Franková, J. & Ulrichová, J. The role of keratinocytes in inflammation. *J. Appl. Biomed.* 15, 169-179 (2017).
 33. Jiang, Y., Tsoi, L., Billi, A., Ward, N., Harms, P., Zeng, C., Maverakis, E., Kahlenberg, J. & Gudjonsson, J. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight* 5, (2020).
 34. Gröne, A. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 1-12 (2002).
 35. Lebre, M., van der Aar, A., van Baarsen, L., van Capel, T., Schuitemaker, J., Kapsenberg, M. & de Jong, E. Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* 127, 331-341 (2007).
 36. Fenini, G., Grossi, S., Contassot, E., Biedermann, T., Reichmann, E., French, L. & Beer, H. Genome Editing of Human Primary Keratinocytes by CRISPR/Cas9 Reveals an Essential Role of the NLRP1 Inflammasome in UVB Sensing. *J. Invest. Dermatol.* 138, 2644-2652 (2018).
 37. Swanson, K., Deng, M. & Ting, J. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 477-489 (2019).
 38. Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S. & Beer, H. The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 β by Keratinocytes. *Curr. Biol.* 17, 1140-1145 (2007).
 39. Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. & Girolomoni, G. Keratinocytes in Inflammatory Skin Diseases. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy* 4, 329-334 (2005).
 40. Komine, M., Rao, L., Freedberg, I., Simon, M., Milisavljevic, V. & Blumenberg, M. Interleukin-1 Induces Transcription of Keratin K6 in Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 116, 330-338 (2001).
 41. Nestle, F., Di Meglio, P., Qin, J. & Nickoloff, B. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679-691 (2009).
 42. Dinarello, C. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 281, 8-27 (2018).
 43. Bent, R., Moll, L., Grabbe, S. & Bros, M. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies?. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2155 (2018).
 44. Di Paolo, N. & Shayakhmetov, D. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat. Immunol.* 17, 906-913 (2016).
 45. Kim, B., Lee, Y., Kim, E., Kwak, A., Ryoo, S., Bae, S., Azam, T., Kim, S. & Dinarello, C. The Interleukin-1 α Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. *Front. Immunol.* 4, (2013).

46. Cai, Y., Xue, F., Quan, C., Qu, M., Liu, N., Zhang, Y., Fleming, C., Hu, X., Zhang, H., Weichselbaum, R., Fu, Y., Tieri, D., Rouchka, E., Zheng, J. & Yan, J. A Critical Role of the IL-1 β -IL-1R Signaling Pathway in Skin Inflammation and Psoriasis Pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 139, 146-156 (2019).
47. Sugawara, T., Gallucci, R., Simeonova, P. & Luster, M. Regulation and Role of Interleukin 6 in Wounded Human Epithelial Keratinocytes. *Cytokine* 15, 328-336 (2001).
48. Hernández-Quintero, M., Kuri-Harcuch, W., González Robles, A. & Castro-Muñozledo, F. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.* 325, 77-90 (2006).
49. Oliveira, C., Sakata, R., Issy, A., Gerola, L. & Salomão, R. Citocinas e dor. *Rev. Bras. Anestesiologia.* 61, 260-265 (2011).
50. Köck, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. & Luger, T. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* 172, 1609-1614 (1990).
51. Banno, T., Gazel, A. & Blumenberg, M. Effects of Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) in Epidermal Keratinocytes Revealed Using Global Transcriptional Profiling. *J. Biol. Chem.* 279, 32633-32642 (2004).
52. Randall, M., Jünger, A., Rimann, M. & Wuertz-Kozak, K. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6, (2018).
53. Niehues, H. & van den Bogaard, E. Past, present and future of in vitro 3D reconstructed inflammatory skin models to study psoriasis. *Exp. Dermatol.* 27, 512-519 (2018).
54. Yu, J., Navarro, J., Coburn, J., Mahadik, B., Molnar, J., Holmes, J., Nam, A. & Fisher, J. Current and Future Perspectives on Skin Tissue Engineering: Key Features of Biomedical Research, Translational Assessment, and Clinical Application. *Adv. Healthc. Mater.* 8, 1801471 (2019).
55. Dijkhoff, I., Petracca, B., Prioux, R., Valacchi, G., Rothen-Rutishauser, B. & Eeman, M. Cultivating a Three-dimensional Reconstructed Human Epidermis at a Large Scale. *J. Vis. Exp.* (2021).
56. Reijnders, C., van Lier, A., Roffel, S., Kramer, D., Scheper, R. & Gibbs, S. Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Eng. Part A* 21, 2448-2459 (2015).
57. Moysidou, C., Barberio, C. & Owens, R. Advances in Engineering Human Tissue Models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, (2021).
58. Aleemardani, M., Trikić, M., Green, N. & Claeysens, F. The Importance of Mimicking Dermal-Epidermal Junction for Skin Tissue Engineering: A Review. *Bioengineering* 8, 148 (2021).
59. Jahanshahi, M., Hamdi, D., Godau, B., Samiei, E., Sanchez-Lafuente, C., Neale, K., Hadisi, Z., Dabiri, S., Pagan, E., Christie, B. & Akbari, M. An Engineered Infected Epidermis Model for In Vitro Study of the Skin's Pro-Inflammatory Response. *Micromachines* 11, 227 (2020).
60. Klicks, J., von Molitor, E., Ertongur-Fauth, T., Rudolf, R. & Hafner, M. In vitro skin three-dimensional models and their applications. *J. Cell. Biotechnol.* 3, 21-39 (2017).
61. Romo-Morales, A. & Przyborski, S. in *Technology Platforms for 3D Cell Culture*. 1-16 (Wiley Blackwell, 2017).
62. Fontoura, J., Viezzer, C., dos Santos, F., Ligabue, R., Weinlich, R., Puga, R., Antonow, D., Severino, P. & Bonorino, C. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Mater. Sci. Eng. C* 107, 110264 (2020).
63. Pruniéras, M., Régnier, M. & Woodley, D. Methods for Cultivation of Keratinocytes with an Air-Liquid Interface. *J. Invest. Dermatol.* 81, S28-S33 (1983).
64. Rikken, G., Niehues, H. & van den Bogaard, E. in *Molecular Dermatology: Methods and Protocols* (ed. Botchkareva, N. & Westgate, G.) 45-61 (Humana Press, 2020).

65. Park, K., Choi, H., Cho, H., Kim, S., Kwon, S., Kim, D. & Cho, Y. Effects of Ascorbic Acid on Keratinocyte and Epidermalization of Skin. *Ann. Dermatol.* 16, 45 (2004).
66. Savini, I., Rossi, A., Duranti, G., Avigliano, L., Catani, M. & Melino, G. Characterization of Keratinocyte Differentiation Induced by Ascorbic Acid: Protein Kinase C Involvement and Vitamin C Homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 118, 372-379 (2002).
67. Teimouri, A., Yeung, P. & Agu, R. in *Cell Culture* (ed. Mehanna, R.) 1-18 (IntechOpen, 2019).
68. Choudhury, S. & Das, A. Advances in generation of three-dimensional skin equivalents: pre-clinical studies to clinical therapies. *Cytotherapy* 23, 1-9 (2021).
69. Dickson, M., Hahn, W., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J., Weinberg, R., Louis, D., Li, F. & Rheinwald, J. Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16 INK4a -Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics. *Mol. Cell Biol.* 20, 1436-1447 (2000).
70. Choi, M. & Lee, C. Immortalization of Primary Keratinocytes and Its Application to Skin Research. *Biomol. Ther.* 23, 391-399 (2015).
71. Smits, J., Niehues, H., Rikken, G., van Vlijmen-Willems, I., van de Zande, G., Zeeuwen, P., Schalkwijk, J. & van den Bogaard, E. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci. Rep.* 7, (2017).
72. Mathes, S., Ruffner, H. & Graf-Hausner, U. The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69-70, 81-102 (2014).
73. Coolen, N., Vlig, M., van den Bogaardt, A., Middelkoop, E. & Ulrich, M. Development of an in vitro burn wound model. *Wound Repair Regen.* 16, 559-567 (2008).
74. Coté, R., Aseptic Technique for Cell Culture. *Curr. Protoc. Cell Biol.* (1998).
75. Kielberg, V. Cryopreservation of Mammalian Cells. Technical Note No. 14, *Thermo Fisher Scientific Inc.* (2010)
76. Lai, J. & Pittelkow, M. Culture confluence regulates gene expression of normal human keratinocytes. *Wound Repair Regen.* 12, 613-617 (2004).
77. Poumay, Y. & Pittelkow, M. Cell Density and Culture Factors Regulate Keratinocyte Commitment to Differentiation and Expression of Suprabasal K1/K10 Keratins. *J. Invest. Dermatol.* 104, 271-276 (1995).
78. Charest, J., Jennings, J., King, W., Kowalczyk, A. & García, A. Cadherin-Mediated Cell–Cell Contact Regulates Keratinocyte Differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 129, 564-572 (2009).
79. Wufuer, M., Lee, G., Hur, W., Jeon, B., Kim, B., Choi, T. & Lee, S. Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment. *Sci. Rep.* 6, (2016).
80. Hernández, A., Vallejo, B., Ruzgas, T. & Björklund, S. The Effect of UVB Irradiation and Oxidative Stress on the Skin Barrier—A New Method to Evaluate Sun Protection Factor Based on Electrical Impedance Spectroscopy. *Sensors* 19, 2376 (2019).
81. Diffey, B. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28, 4-13 (2002).
82. Bernerd, F., Del Bino, S. & Asselineau, D. Regulation of Keratin Expression by Ultraviolet Radiation: Differential and Specific Effects of Ultraviolet B and Ultraviolet A Exposure. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1421-1429 (2001).
83. Chung, J., Youn, S., Koh, W., Eun, H., Cho, K., Park, K. & Youn, J. Ultraviolet B Irradiation-Enhanced Interleukin (IL)-6 Production and mRNA Expression Are Mediated by IL-1 α in Cultured Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 106, 715-720 (1996).
84. Alhabbab, R. in *Basic Serological Testing* (ed. Alhabbab, R.) 83-95 (Springer, Cham, 2018).
85. Pamies, D., Bal-Price, A., Chesné, C., Coecke, S., Dinnyes, A., Eskes, C., Grillari, R., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Jennings, P., Leist, M., Martin, U., Passier, R., Schwamborn, J., Stacey, G.,

- Ellinger-Ziegelbauer, H. & Daneshian, M. Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems. *ALTEX* 35, 353-378 (2018).
86. Bataillon, M., Lelièvre, D., Chapuis, A., Thillou, F., Autourde, J., Durand, S., Boyera, N., Rigaudau, A., Besné, I. & Pellevoisin, C. Characterization of a New Reconstructed Full Thickness Skin Model, T-Skin™, and its Application for Investigations of Anti-Aging Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2240 (2019).
 87. Haines, R. & Lane, E. Keratins and disease at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 3923-3928 (2012).
 88. Nagarajan, P., Romano, R. & Sinha, S. Transcriptional Control of the Differentiation Program of Interfollicular Epidermal Keratinocytes. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 57-79 (2008).
 89. Chou, S., Azuma, Y., Varia, M. & Raleigh, J. Evidence that involucrin, a marker for differentiation, is oxygen regulated in human squamous cell carcinomas. *Br. J. Cancer* 90, 728-735 (2004).
 90. Crish, J., Bone, F., Banks, E. & Eckert, R. The human involucrin gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation. *Oncogene* 21, 738-747 (2002).
 91. D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. & Scott, T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12222-12248 (2013).
 92. Matsui, T. & Amagai, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int. Immunol.* 27, 269-280 (2015).
 93. Smiley, A., Klingenberg, J., Boyce, S. & Supp, D. Keratin expression in cultured skin substitutes suggests that the hyperproliferative phenotype observed in vitro is normalized after grafting. *Burns* 32, 135-138 (2006).
 94. Gibbs, S., Silva Pinto, A., Murli, S., Huber, M., Hohl, D. & Ponc, M. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen.* 8, 192-203 (2000).
 95. Latkowski, J., Freedberg, I. & Blumenberg, M. Keratinocyte growth factor and keratin gene regulation. *J. Dermatol. Sci.* 9, 36-44 (1995).
 96. Krejčí, E., Kodet, O., Szabo, P., Borský, J., Smetana, K., Grim, M. & Dvořánková, B. In Vitro Differences of Neonatal and Later Postnatal Keratinocytes and Dermal Fibroblasts. *Physiol. Res.* 561-569 (2015).
 97. Zhao, H., Xiao, T. & Chen, Y. Ultraviolet Induced Skin Inflammation. *Int. J. Dermatol. Venereol.* 4, 229-235 (2021).
 98. Horio, T., Miyauchi, H., Sindhvananda, I., Soh, H., Kurokawa, I. & Asada, Y. The effect of ultraviolet (UVB and PUVA) radiation on the expression of epidermal keratins. *Br. J. Dermatol.* 128, 10-15 (1993).
 99. Smith, M. & Rees, J. Wavelength-Specific Upregulation of Keratin mRNA Expression in Response to Ultraviolet Radiation. *J. Invest. Dermatol.* 102, 433-439 (1994).
 100. Kirnbauer, R., Köck, A., Neuner, P., Förster, E., Krutmann, J., Urbanski, A., Schauer, E., Ansel, J., Schwarz, T. & Luger, T. Regulation of Epidermal Cell Interleukin-6 production by UV Light and Corticosteroids. *J. Invest. Dermatol.* 96, 484-489 (1991)
 101. Johnson, K., Wulff, B., Oberyszyn, T. & Wilgus, T. Ultraviolet light exposure stimulates HMGB1 release by keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 305, 805-815 (2013).
 102. Kupper, T., Chua, A., Flood, P., McGuire, J. & Gubler, U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J. Clin. Investig.* 80, 430-436 (1987).
 103. Amsen, D., de Visser, K. & Town, T. Approaches to Determine Expression of Inflammatory Cytokines. *Methods Mol Biol* 511, 1-27 (2009).

104. Santos, M., Paramio, J., Bravo, A., Ramirez, A. & Jorcano, J. The Expression of Keratin K10 in the Basal Layer of the Epidermis Inhibits Cell Proliferation and Prevents Skin Tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 19122-19130 (2002).
105. de Vos, S., Brach, M., Budnik, A., Grewe, M., Herrmann, F. & Krutmann, J. Post-Transcriptional Regulation of Interleukin-6 Gene Expression in Human Keratinocytes by Ultraviolet B Radiation. *J. Invest. Dermatol.* 103, 92-96 (1994).
106. Hayden, M. & Ghosh, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin. Immunol.* 26, 253-266 (2014).
107. Kim, B., Howell, M., Guttman, E., Gilleaudeau, P., Cardinale, I., Boguniewicz, M., Krueger, J. & Leung, D. TNF- α Downregulates Filaggrin and Loricrin through c-Jun N-terminal Kinase: Role for TNF- α Antagonists to Improve Skin Barrier. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1272-1279 (2011).
108. Komine, M., Rao, L., Kaneko, T., Tomic-Canic, M., Tamaki, K., Freedberg, I. & Blumenberg, M. Inflammatory Versus Proliferative Processes in Epidermis. *J. Biol. Chem.* 275, 32077-32088 (2000).
109. Udommethaporn, S., Tencomnao, T., McGowan, E. & Boonyaratanakornkit, V. Assessment of Anti-TNF- α Activities in Keratinocytes Expressing Inducible TNF- α : A Novel Tool for Anti-TNF- α Drug Screening. *PLoS ONE* 11, e0159151 (2016).
110. Choi, D. & Hwang, H. Anti-inflammation activity of brazilin in TNF- α induced human psoriasis dermatitis skin model. *Appl. Biol. Chem.* 62, (2019).
111. Kupper, T., Lee, F., Birchall, N., Clark, S. & Dower, S. Interleukin 1 binds to specific receptors on human keratinocytes and induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein. A potential autocrine role for interleukin 1 in epidermis. *J. Clin. Investig.* 82, 1787-1792 (1988).
112. Dolińska, B., Ostróżka-Cieślik, A., Caban, A., Rimantas, K., Leszczyńska, L. & Ryszka, F. Influence of Trace Elements on Stabilization of Aqueous Solutions of Ascorbic Acid. *Biol. Trace Elem. Res.* 150, 509-512 (2012).
113. Pamies, D., Leist, M., Coecke, S., Bowe, G., Allen, D., Gstraunthaler, G., Bal-Price, A., Pistollato, F., de Vries, R., Hogberg, H., Hartung, T. & Stacey, G. Guidance document on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (GCCP 2.0). *ALTEX* 39, 30-70 (2021).