



Área: Tecnológicas

## Projeto e construção de estrutura 3D para mimetização da topografia derme/epiderme para crescimento de células epiteliais

Naiara Godoi\*, Franciele Flores Vit, Rony Nunes, Hernandes F. de Carvalho, Lucimara G. de La Torre

**Resumo:** O desenvolvimento de modelos *in vitro* que representem com precisão o comportamento *in vivo* é de interesse de áreas, como indústria farmacêutica, cosmética, médica e pesquisas biológicas. O investimento em tais modelos vislumbra a redução de tempo, custos e testes em animais que visam aprovar produtos ou compreender o comportamento dos órgãos humanos. Estudos já comprovaram a influência da matriz celular, assim como sua topografia, no comportamento das células das camadas mais externas da pele (epiderme-derme), no entanto estudos convencionais ocorrem em modelos *in vitro* 2D que desconsideram estas influências. Neste contexto, o projeto teve por objetivo propor um processo de formação da topografia epiderme-derme, sobre hidrogel de colágeno tipo I, com o auxílio de um micromolde fabricado em impressora 3D-SLA. Foi possível comprovar a eficácia da moldagem, sem que o procedimento impedisse o crescimento de células no interior (fibroblastos) e na superfície (queratinócitos) da matriz.

**Palavras-chave:** topografia, micromoldagem, interface epiderme-derme.

### Introdução

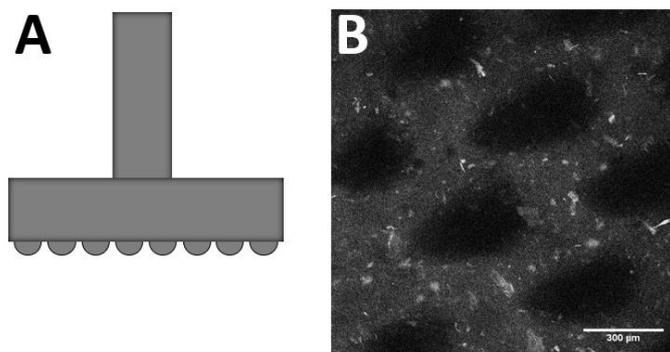
A pele, órgão mais extenso do corpo humano, pode ser acometida por doenças que variam desde acne até câncer<sup>1</sup>. O desenvolvimento do tratamento destas enfermidades envolve inúmeros testes, sendo grande parte deles realizados em animais. Este processo, além de demorado e dispendioso, muitas vezes não prevê com precisão o comportamento das células humanas frente aos compostos desenvolvidos, resultando em reprovações apenas nas avaliações em humanos. Neste contexto, o desenvolvimento de modelos *in vivo* mais fidedignos ao ambiente natural é de interesse de indústria farmacêutica, cosmética, além de áreas voltadas para pesquisas biológicas<sup>2,3</sup>.

Estudos reportarem que a cultura celular é influenciada pela matriz extracelular, distribuição das células na cultura e seu tamanho. Com isso, o desenvolvimento de culturas 3D tornou-se uma alternativa promissora para mimetizar o que ocorre *in vivo*, uma vez que a interface epiderme-derme humana não é plana<sup>4,5</sup>.

Viswanathan *et al.* (2016) desenvolveram uma plataforma capaz de recriar a topografia epiderme-derme a partir da técnica de litografia macia, utilizando diferentes máscaras e tempos de exposição à luz UV. Apenas dos resultados satisfatórios, a metodologia utilizada envolvia mais de uma etapa até a formação da topografia. Neste cenário, o projeto propôs recriar a interface epiderme-derme em uma etapa única, sobre uma matriz de hidrogel de colágeno, a partir da técnica de micromoldagem, utilizando micromoldes produzidos em impressora 3D-SLA (esteriolitografia)<sup>6</sup>.

## Resultados e discussão

O processo proposto neste projeto para criação da micromoldagem se resumiu em: (1) adicionar a solução de gel de colágeno contendo fibroblastos ao poço de cultura e aguardar sua pré-gelificação; (2) posicionar o molde sobre o hidrogel e aguardar a gelificação do sistema submetido à moldagem; (3) adicionar meio de cultura contendo queratinócitos. Os micromolde projetado, assim como a topografia criada no hidrogel de colágeno estão apresentadas na Figura 1.



A partir da Figura 1, é possível observar que a atuação do micromolde sobre o hidrogel recria padrões em sua superfície, no entanto, não foi possível quantificar com precisão as dimensões formadas. Com isso, buscando validar a o processo, inicialmente foi comprovada a viabilidade dos fibroblastos no interior da matriz de colágeno. Para tal, utilizou-se imagens sequenciais que comprovaram sua movimentação neste meio. Além disso, estas células apresentaram morfologia aparentemente saudável (Figura 2).

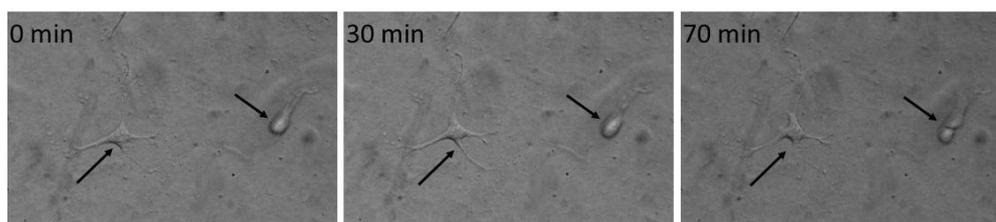


Fig. 2 – Imagens de microscopia Time-Lapse apontando os fibroblastos (indicados por setas) em gel de colágeno tipo I moldado, obtidas por Microscópio de Fluorescência Invertido Zeiss (Carl Zeiss AG, Alemanha). Da esquerda para a direita temos o tempo zero, 30 minutos e 70 minutos.

Por fim, validou-se a viabilidade dos queratinócitos cultivados sobre o colágeno micromoldado, a partir de microscopia confocal (Figura 3).

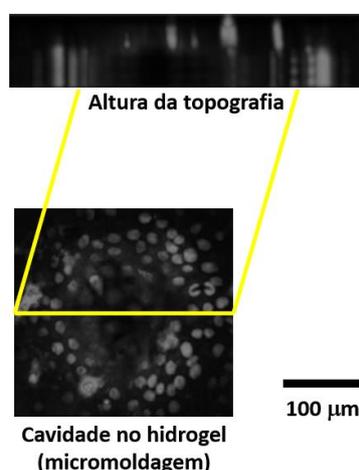


Fig. 3 - Imagem obtidas por Microscópio de Fluorescência Invertido Zeiss LSM880 com Airyscan (Carl Zeiss AG, Alemanha), após 24h de cultivo de fibroblastos e 12h de cultivo de queratinócitos. As células foram fixadas com paraformaldéido 4% e glutaraldéido 2,5%, o núcleo foi marcado com DAPI.

Assim como os fibroblastos, as células de queratinócitos sugeriram apresentar morfologia saudável, em especial por apresentarem núcleos bem delimitados (pontos brancos na Figura 3). A partir da imagem obtida por microscopia confocal, foi possível analisar as dimensões extraídas de cortes ortogonais do hidrogel, concluindo que as alturas criadas sobre o hidrogel apresentava dimensão próxima da projetada para o micromolde (100  $\mu\text{m}$ ).

## Conclusões

O dispositivo projetado foi capaz de criar uma topografia uniforme no colágeno, através de uma única etapa de moldagem. Sua aplicação não inibi o crescimento celular tanto no interior da matriz, quanto em sua superfície.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Matriz Extracelular e Regulação da Expressão Gênica, ao Laboratório de Microfabricação do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LMF-CNPEM), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INCT-INFABiC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## Referências

1. Warburton D. *Stem Cells, Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2015.
2. MORAES M. E. A. MM. Ensaio Clínicos de Medicamentos no Brasil.
3. Bergers LIJC, Reijnders CMA, van den Broek LJ, et al. Immune-competent human skin disease models. *Drug Discovery Today*. 2016;21(9):1479-1488. doi:10.1016/j.drudis.2016.05.008
4. Watt FM. Mammalian skin cell biology: At the interface between laboratory and clinic. *Science*. 2014;346(6212). doi:10.1126/science.1253734
5. Price AJ, Huang EY, Sebastiano V, Dunn AR. A semi-interpenetrating network of polyacrylamide and recombinant basement membrane allows pluripotent cell culture in a soft, ligand-rich microenvironment. *Biomaterials*. 2017;121:179-192. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.12.005