



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ARTUR CHRISTIAN GARCIA DA SILVA**

---

**Estratégias de bioengenharia e Novas Abordagens  
Metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação do potencial de  
sensibilização pulmonar de toxicantes inalados**

---

**GOIÂNIA  
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFMG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFMG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### 2. Nome completo do autor

Artur Christian Garcia da Silva

#### 3. Título do trabalho

Estratégias de bioengenharia e Novas Abordagens Metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação do potencial de sensibilização pulmonar de toxicantes inalados

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
  - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **ARTUR CHRISTIAN GARCIA DA SILVA**, Discente, em 28/11/2022, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Marize Campos Valadares**, Professor do Magistério Superior, em 02/12/2022, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3358943** e o código CRC **4D253B88**.

---

**ARTUR CHRISTIAN GARCIA DA SILVA**

---

---

**Estratégias de bioengenharia e Novas Abordagens  
Metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação do potencial de  
sensibilização pulmonar de toxicantes inalados**

---

---

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

**GOIÂNIA  
2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Artur Christian Garcia da  
Estratégias de bioengenharia e Novas Abordagens Metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação do potencial de sensibilização pulmonar de toxicantes inalados. [manuscrito] / Artur Christian Garcia da Silva. - 2022.

117 f.

Orientador: Profa. Dra. Marize Campos Valadares.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2022.

Bibliografia. Anexos.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Sensibilização respiratória. 2. Alergia química respiratória. 3. Novas abordagens metodológicas. 4. Toxicidade pulmonar. 5. Bioengenharia.  
I. Valadares, Marize Campos, orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 114 da sessão de Defesa de Tese de **Artur Christian Garcia da Silva** que confere o título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **dez dias do mês de novembro de dois mil e vinte e dois**, a partir das **13:30 horas**, no **Auditório do LIFE (Parque Tecnológico Samambaia)**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“Estratégias de bioengenharia e Novas Abordagens Metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação do potencial de sensibilização pulmonar de toxicantes inalados”**. Os trabalhos foram instalados pela orientadora, **Professora Doutora Marize Campos Valadares (FF/UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Doutora Jacqueline Alves Leite (ICB/UFG)**, membro titular externo; **Professor Doutor Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)**, membro titular interno; **Professora Doutora Simone Gonçalves da Fonseca (IPTSP/UFG)**, membro titular externo; **Professor Doutor Andris Figueiroa Bakuzis (IF/UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela **Professora Doutora Marize Campos Valadares (FF/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **dez dias do mês de novembro de dois mil e vinte e dois**.

## TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Da Cunha, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2022, às 07:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andris Figueiroa Bakuzis, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2022, às 08:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves Da Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 24/11/2022, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Alves Leite, Professora do Magistério Superior**, em 25/11/2022, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marize Campos Valadares, Professor do Magistério Superior**, em 05/12/2022, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3358936 e o código CRC A2D5963F.

---

Referência: Processo nº 23070.059747/2022-60

SEI nº 3358936



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Eric de Souza Gil

**Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação**

Profa. Dra. Stephania Fleury Taveira

**GOIÂNIA  
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BANCA EXAMINADORA**

**Aluno: Artur Christian Garcia da Silva**

**Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares**

**Profa. Dra. Marize Campos Valadares / Presidente**

Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha / Membro Titular**

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca / Membro Titular**

Professora Associada do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, IPTSP/UFG

**Profa. Dra. Jacqueline Alves Leite / Membro Titular**

Professora Adjunta do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, ICB/UFG

**Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis / Membro Titular**

Professor Titular do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, IF/UFG

**Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira / Membro Suplente**

Professora Adjunta da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG

**Dra. Nathalia Correa de Almeida Oliveira / Membro Suplente**

Pesquisadora na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG

**Data: 10/11/2022**

*Aos meus pais Cláudia Valéria da Silva e Luzivon Garcia Pereira.*

*À Profa. Dra. Marize Campos Valadares.*

*Não te deixes destruir...  
Ajuntando novas pedras  
e construindo novos poemas.*

*Recria tua vida, sempre, sempre.  
Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.*

*Faz de tua vida mesquinha  
um poema.  
E viverás no coração dos jovens  
e na memória das gerações que hão de vir.*

*Esta fonte é para uso de todos os sedentos.  
Toma a tua parte.  
Vem a estas páginas  
e não entres seu uso  
aos que têm sede.*

*Cora Coralina*

## AGRADECIMENTOS

---

*Mesmo consciente de que o alcance das minhas palavras pode ser limitado para expressar toda a magnitude de minha gratidão por aqui chegar, espero que, nesta seção menos técnica desse documento, a minha subjetividade seja minimamente eficiente para expressar minha gratidão àqueles e àquelas que me permitiram aqui estar...*

*...a Deus que até aqui me guiou e conduziu. Independentemente do que eu aqui escrever, nada será minimamente comparável ao Seu cuidado comigo. Obrigado por povoar meu caminho com seus anjos, por me apontar os caminhos quando minha visão falhou, por me cuidar de forma tão afável e detalhista e por fazer me sentir como o mais amado de seus filhos. Que eu tenha ombridade suficiente para honrar o caminho que o Senhor me confiou, e use tudo o que aprendi até aqui para ajudar na cura das dores do mundo.*

*...aos meus pais Cláudia Valéria da Silva e Luzivon Garcia Pereira, e à minha irmã Thauâny Christie Garcia da Silva, obrigado por serem as raízes nas quais eu pude levantar minhas copas. Obrigado por todas as renúncias, por todos os princípios e valores repassados que me guiaram e guiarão permanentemente. Obrigado por chorarem comigo a cada batalha perdida, e por vibrarem a cada medalha conquistada. Mas, mais do que isso, obrigado por entrarem na arena comigo segurando minha mão, por secarem o suor do meu rosto e por me alimentarem quando a exaustão me alcançou. Chegar aqui só foi possível com o amparo inesgotável de vocês. Muito obrigado!*

*...à Profa. Dra. Marize Campos Valadares. Obrigado pelo seu “sim” que mudou minha vida naquela tarde de terça-feira. Dos anjos que Deus me apresentou, você foi, sem nenhuma dúvida, o que eu mais tive certeza de ser meu guardião. Obrigado por ser farol e ponte. Farol que me guiou pelos oceanos da ciência e lançou luz em cantos obscuros para me mostrar possibilidades que eu jurava nunca poder alcançar. Ponte que me fez atravessar e me sentir parte de algo muito, muito maior! Trabalhar com você é um privilégio e uma alegria. Obrigado por adicionar vida aos meus dias! Parafraseando o grande pensador Pe. Fábio de Melo: “Eu gostaria de lhe agradecer pelas inúmeras*

*vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela sua capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente já me olhou depressa demais.”*

*...à equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia In Vitro (Tox In). Obrigado por tornarem os dias mais leves, divertidos e doces com os lanches que gostamos de compartilhar. Queridos e queridas Ana Clara Stival, Bruna Pedralli, Jordana Andrade, Lara Brito, Leandro Leal, Marcella Furtuoso, Thaís Rosa, Aliny Pereira, Amanda Cecília, Eunice Carrijo, Jacqueline Leite, Kvetta Tavares, Lauren Dalat, Maria Cláudia Passos, Maria de Fátima, Matheus Carneiro, Paula Melo, Rafaela Campos, Evelyn Araújo, Pedro Souza, Wanessa Dias, Igor Oliveira, Isabela Fonseca, Lucas Canêdo e Bruna Verônica, muito obrigado por compartilharem o cotidiano, os prazeres e dissabores da vida acadêmica!*

*...aos meus queridos alunos de Iniciação Científica Sérgio de Moraes Carvalho Filho e Izadora Caroline Furtado de Mendonça. Meus sinceros agradecimentos por todo o apoio desprendido para ajudar na execução desse trabalho. Vocês foram fiéis pupilos que me ensinaram a como transferir o que sei e ensinar o que aprendi. Obrigado pela confiança, pelo entusiasmo, pela lealdade e por dividirem em partes iguais comigo os sucessos e insucessos desse projeto no qual embarcamos juntos. O futuro de vocês é brilhante, e me sinto honrado por ter feito parte de um pedacinho dessa história.*

*...à minha querida tia Cleide Aparecida da Silva (in memoriam). Obrigado por me apoiar em todos os meus sonhos desde muito pequeno. Por ser o colo que me afagou quando muitos não eram capazes de entender quem eu era de fato. Você foi uma das minhas maiores referências de zelo, carinho, cuidado e amor, e sigo sabendo que, de onde quer que você esteja, vibra com cada degrau alcançado por mim. Obrigado por tanto!*

*...à ex-diretora da Faculdade de Farmácia, Profa. Dra. Maria Teresa de Freitas Bara. Obrigado por me acolher de forma tão carinhosa e gentil quando me tornei parte do corpo de técnicos-administrativos da FF. Foi muito bom retornar à casa que me formou sendo recebido por um abraço tão acolhedor!*

*...à Profa. Dra. Aline Carvalho Batista (in memoriam). Obrigado por todos os ensinamentos, conselhos e por me ensinar de forma tão cuidadosa muito do que sei sobre histotécnica. Seu sorriso, seu alto-astral e sua gentileza vão sempre servir de exemplo em minha caminhada.*

*...à querida secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Fernanda Maura Ferreira Bellato. Obrigado pelo imenso cuidado, solícitude, prestatividade, carinho e prontidão a nos atender.*

*...aos meus queridos amigos que fiz na TissUse GHBM enquanto estive em Berlim fazendo meu Doutorado Sanduíche. Agradeço imensamente à Dra. Eva Dehne por ter me recebido de forma tão acolhedora e prestativa durante o período que permaneci em intercâmbio. Você foi mais um dos anjos que cruzaram meu caminho, e seu profissionalismo, leveza e gentileza são coisas nas quais sempre vou me espelhar enquanto profissional. Obrigado ao Dr. Reyk Horland pela oportunidade de integrar a equipe da TissUse durante o período que lá estive e ao Dr. Uwe Marx por abrir as portas da empresa para a realização do estágio. À querida Thi Phuong Tao por ser a melhor parceira de pesquisa que eu poderia ter. Obrigado pelos conselhos, desabafos e pelas melhores dicas de turismo gastronômico! Um obrigado especial ao Daniel Faust, pela solícitude e pelos ensinamentos sobre a plataforma Humimic e à Irit Vahav pelo auxílio indispensável com os experimentos de velocimetria de partículas. Aos demais colegas, Annika Winter, Ilka Maschmeyer, Beren Ataç, Katharina Schimek, Christine Schwenk, Alicia Oberlander, Michelle Jaschke, Corinna Magauer, Naima Calderón, Jessica Wiest, Isabel Rutschle, Behrooz Yazdi, Enrico Acastelli, Florian Huber, Alexander Paner, Alexandra Lorenz, Hendrik Erfurth, Sophie Rigal, Anja Ramme, Ricky Bayer, Leopold Koning, Isabell Durieux and Filippos Gavriilidis. Obrigado por me acolherem e me ensinarem um pouco sobre sistemas microfisiológicos e muito sobre a forma de viver alemã!*

*...a todos os professores que passaram pelo meu caminho durante minha trajetória acadêmica. Vocês foram e serão sempre inspiração para que eu siga perseguindo a excelência.*

*...aos queridos amigos que deixaram o laboratório, mas permaneceram no coração e na vida: Larissa Cleres, Tatyane Hayasakı e Victor Vasconcelos.*

*...aos colegas dos Laboratórios Integrados para Inovação em Ciências Farmacêuticas (LIFE) pela partilha do cotidiano de forma sempre tão agradável e gentil.*

*...a todos os familiares e amigos que compartilharam comigo essa caminhada, fazendo os dias mais felizes.*

*...às agências de fomento que permitiram a execução desse trabalho, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).*

*O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

1	INTRODUÇÃO .....	28
1.1	– Sistema respiratório .....	28
1.2	– Sensibilização respiratória .....	31
1.2.1	– Via de efeito adverso da sensibilização respiratória .....	33
1.3	– Modelos experimentais para avaliação do potencial de sensibilização pulmonar de toxicantes .....	41
1.3.1	– Modelos <i>in vivo</i> .....	41
1.3.2	– Novas abordagens metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação de toxicidade pulmonar .....	43
1.3.3	– Estratégias de bioengenharia aplicadas ao contexto da avaliação de toxicidade pulmonar .....	51
2	OBJETIVOS .....	58
2.1	– Objetivo geral.....	58
2.2	– Objetivos específicos .....	58
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	60
3.1	– Delineamento experimental.....	60
3.1	– Cultivo celular .....	62
3.2	– Avaliação da citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios sobre as linhagens celulares em monocamada .....	64
3.2.1	– Seleção e preparo dos sensibilizantes respiratórios .....	64
3.2.2	– Avaliação da citotoxicidade das substâncias-teste pelo método de redução do MTT.....	66
3.3	– Avaliação do potencial de complexação das substâncias-teste com mucina por meio de avaliação espectroscópica .....	70
3.4	– Avaliação do perfil inflamatório das linhagens celulares após exposição aos sensibilizantes respiratórios .....	71
3.5	– Avaliação da expressão de ICAM-1 pela linhagem endotelial EA.hy926.....	74
3.5.1	– Citometria de fluxo.....	74
3.5.2	– Imunofluorescência indireta.....	75
3.6	– Avaliação da expressão dos biomarcadores MUC1 e Nrf-2 pela linhagem epitelial brônquica BEAS-2B .....	75
3.7	– Avaliação da expressão dos marcadores de superfície CD86, HLA-DR e CD11c pela linhagem monocítica THP-1 .....	77
3.7.1	– Avaliação da citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios frente às células THP-1 por citometria de fluxo .....	77
3.7.2	– Avaliação da expressão dos biomarcadores CD86, HLA-DR e CD11c.....	78

3.8 - Obtenção e caracterização do modelo epitelial brônquico 3D de co-cultura das linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1 .....	79
3.8.1 – Caracterização histomorfológica do modelo 3D de co-cultura .....	82
3.9 - Padronização e dosimetria do sistema de nebulização VitroCell® Cloud 12™ para posterior exposição dos modelos 3D de co-cultura .....	86
3.10 - Exposição do modelo 3D de co-cultura a aerossóis do sensibilizante respiratório Anidrido Maleico e avaliação de parâmetros inflamatórios e funcionais .....	88
3.10.1 – Avaliação da viabilidade tecidual pelo método de redução do MTT .....	89
3.10.2 – Avaliação do perfil de citocinas inflamatórias produzido pelo modelo 3D de co-cultura e pela linhagem THP-1 .....	90
3.10.3 – Avaliação de estresse oxidativo epitelial.....	91
3.10.4 – Avaliação dos marcadores de dano tecidual/inflamação caspase-3 ativa, MUC1 e NF-kB.....	91
3.11 – Obtenção do modelo epitelial brônquico utilizando como <i>scaffold</i> a parede brônquica suína descelularizada.....	92
3.11.1 – Descelularização por detergentes.....	93
3.11.4 – Caracterização histomorfológica dos fragmentos descelularizados e avaliação dos componentes da matriz extracelular .....	93
3.11.5 – Avaliação da presença de conteúdo celular nos fragmentos mediante marcação com Hoechst 33342 .....	94
3.11.6 – Teste de esterilidade com os fragmentos após o processo de descelularização.....	94
3.11.7 – Obtenção do modelo epitelial brônquico utilizando a matriz descelularizada como <i>scaffold</i> para cultivo em interface ar-líquido (ALI) .....	95
3.12 – Análise estatística .....	96
4 PUBLICAÇÕES.....	98
5 CONCLUSÃO.....	100
6 REFERÊNCIAS.....	104
7 ANEXOS .....	116
7.1 - Anexo 1: Lista de publicações obtidas durante o período de doutorado .....	116

<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabela 1: Descrição dos sensibilizantes respiratórios de baixo peso molecular utilizados como substâncias-teste no presente estudo, bem como da concentração das soluções-estoque e do solvente utilizado no preparo dos mesmos.	65
Tabela 2: Densidade celular e faixa de concentração de cada substância-teste empregadas nos ensaios de citotoxicidade pelo método de redução do MTT.	69
Tabela 3: Etapas do procedimento de processamento da porção superior do modelo 3D de co-cultura (células BEAS-2B e MRC-5) para avaliação histomorfológica.	83
Tabela 4: Relação descritiva dos anticorpos utilizados para a caracterização do modelo 3D de co-cultura pela técnica de imunofluorescência indireta.	85

Título	Página
Figura 1: Representação esquemática da anatomia e histologia do sistema respiratório humano.	29
Figura 2: Fotomicrografia representativa do epitélio de revestimento das vias aéreas, apontando os principais tipos celulares e estruturas histológicas encontrados nesse tecido.	30
Figura 3: Representação esquemática das etapas que constituem as vias de efeito adverso após exposição a toxicantes	34
Figura 4: Mecanismo de apresentação antigênica aos linfócitos T naïve, bem como diferenciação nas diferentes subpopulações efetoras Th1, Th2 e Th17.	39
Figura 5: Representação esquemática da via de efeito adverso da sensibilização respiratória, construída com base em evidências e proposta por Sullivan et al. (2017).	40
Figura 6: Principais linhagens celulares epiteliais comercialmente disponíveis oriundas dos diferentes segmentos do sistema respiratório.	45
Figura 7: Representação esquemática das principais diferenças entre o cultivo celular em monocamada e interface ar-líquido	48
Figura 8: Representação esquemática do processo de obtenção das PCLS	50
Figura 9: Representação esquemática do modelo de <i>lung-on-a-chip</i> proposto por Huh e colaboradores (2010).	56
Figura 10: Representação esquemática do desenho experimental das diferentes etapas realizada no presente estudo.	61
Figura 11: Fluxograma do ensaio de citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios de baixo peso molecular, realizado com as linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1 pelo método de redução do MTT.	67
Figura 12: Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade realizado para avaliação dos sensibilizantes respiratórios empregando-se as linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1, por meio do método de redução do MTT.	68

Figura 13: Representação esquemática do ensaio <i>in chemico</i> de complexação dos sensibilizantes respiratórios com a proteína mucina.	71
Figura 14: Representação esquemática da etapa de avaliação do perfil inflamatório nas amostras de sobrenadante e lisado celular das linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1, por meio do método de Cytometric Bead Array (CBA).	73
Figura 15: Representação esquemática do modelo 3D de co-cultura reconstruído mediante utilização das linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1.	80
Figura 16: Fluxograma de obtenção dos modelos brônquicos 3D de co-cultura empregando as linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1.	82
Figura 17: (A) Estrutura do sistema de nebulização VitroCell® Cloud 12™. (B) Representação esquemática dos processos de nebulização e deposição dos aerossóis gerados na câmara de exposição.	87
Figura 18: Representação esquemática do ensaio de viabilidade tecidual do modelo brônquico 3D de co-cultura após exposição a aerossóis do sensibilizante anidrido maleico, por meio do ensaio de redução do MTT.	90
Figura 19: Processo de obtenção dos fragmentos de parede brônquica suína a serem submetidos aos diferentes processos de descelularização.	92
Figura 20: Representação esquemática da obtenção dos modelos epiteliais brônquicos utilizando as células Calu-3 cultivadas em interface ar-líquido (ALI) sobre o bioscaffold oriundo da matriz brônquica suína descelularizada.	96
Figura 21: Descrição sumarizada das principais contribuições do presente estudo para a elucidação da via de efeito adverso da alergia química respiratória.	102

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
ALI	<i>Air-liquid Interface</i>
ANM	Anidrido Maleico
ANT	Anidrido Trimetílico
AO	Asma ocupacional
AOP	<i>Adverse Outcome Pathway</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	<i>Bronchoalveolar lavage</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BEBM	<i>Bronchial Epithelial Basal Medium</i>
BSA	<i>Bovine Serum-albumine</i>
BT	<i>Buehler Test</i>
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CAT	Cloreto de Anidrido Trimetílico
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CDs	Células dendríticas
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular
CLC	Cloreto Cianúrico
CLT	Cloramina-T
CV <sub>80</sub>	Concentração na qual a viabilidade celular é de 80%
Da	Daltons
DAMP's	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>
dECM	<i>Descellularized Extracellular Matrix</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM-HG	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECHA	<i>European Chemical Agency</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético sódico
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>

GAGs	Glicosaminoglicanos
GLU	Glutaraldeído
GPMT	<i>Guinea Pig Maximisation Test</i>
hiPSCs	<i>Human Induced Pluripotent Stem Cells</i>
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
hPCLS	<i>Human Precision-cut Lung Slices</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
LLNA	<i>Local Lymph Node Assay</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPS	<i>Microphysiological systems</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MUC1	Mucina 1
NAMs	<i>New Approach Methodologies</i>
NHBE	<i>Normal Human Bronchial Epithelial cells</i>
NLRs	<i>Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing receptor</i>
Nrf2	Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PAMP's	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCLS	<i>Precision-cut Lung Slices</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PIP	Piperazina
PMA	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
REACH	<i>European regulation on Registration, Evaluation and Restriction of Chemical substances</i>
RPM	Rotações por minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640

rLLNA	<i>Respiratory Local Lymph Node Assay</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
SI	<i>Stimulation Index</i>
SVHC	<i>Substances of Very High Concern</i>
Th1	<i>T-helper 1</i>
Th2	<i>T-helper 2</i>
Th17	<i>T-helper 17</i>
TM	<i>Trademark</i>
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor - <math>\alpha</math></i>
UN GHS	<i>United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
WEA	<i>Work-exacerbated asthma</i>

### **Estratégias de bioengenharia e Novas Abordagens Metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação do potencial de sensibilização pulmonar de toxicantes inalados.**

Da Silva A. C. G.<sup>1</sup>; Valadares, M. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In vitro* (Tox In), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

**Introdução:** A sensibilização respiratória abrange um conjunto de doenças inflamatórias que se manifestam por meio de hiperresponsividade e limitações do fluxo de ar nas vias aéreas inferiores. Apesar da alergia química respiratória (CRA) induzida por sensibilizantes de baixo peso molecular (LMW) ser uma grande preocupação do ponto de vista de classificação e rotulagem de produtos químicos, até o momento não existem métodos disponíveis para avaliação pré-clínica desse desfecho toxicológico, uma vez que os mecanismos de toxicidade destes não estão totalmente compreendidos em níveis celular e molecular. **Objetivos:** Aplicar diferentes abordagens *in vitro* e *in chemico* para determinar aspectos fisiologicamente relevantes da resposta humana à exposição a alérgenos respiratórios de baixo peso molecular, visando contribuir para a elucidação do modo de ação dessa classe de toxicantes e posterior avaliação considerando o contexto pré-clínico.

**Metodologia:** Primeiramente, foi verificado o potencial de interação de sete sensibilizantes respiratórios por meio da avaliação do perfil espectroscópico da proteína mucina na presença e ausência das substâncias avaliadas. Foram também conduzidas avaliações de parâmetros inflamatórios e funcionais de diferentes tipos celulares do trato respiratório, os quais incluíram células epiteliais brônquicas (BEAS-2B), fibroblastos pulmonares (MRC-5), células endoteliais (EA.hy926) e monocíticas (THP-1), após exposição a concentrações sub-citotóxicas de cada sensibilizante. Posteriormente, as linhagens supracitadas foram reunidas para a construção de um modelo 3D bronquial de co-cultura e expostas a aerossóis do sensibilizante anidrido maleico em interface ar-líquido (ALI), para posterior avaliação conjunta de parâmetros inflamatórios e funcionais do tecido. Por fim, foi proposta a construção de um modelo epitelial brônquico utilizando como *scaffold* a parede brônquica suína descelularizada, para o qual foram estudadas diferentes técnicas de obtenção da matriz, bem como o comportamento das células epiteliais na mesma.

**Resultados/Discussão:** Os resultados demonstraram que apesar de alguns sensibilizantes interagirem com a mucina, a formação do complexo toxicante-mucina não demonstrou ser uma característica comum às diferentes classes químicas de alérgenos. Em nível celular, os sensibilizantes químicos promoveram um aumento significativo na produção de IL-8, IL-6 e IL-1 $\beta$  considerando os diferentes tipos celulares avaliados. Os compostos também reduziram a expressão de MUC1 pelas células epiteliais brônquicas BEAS-2B e promoveram ativação das células endoteliais EA.hy926, demonstrado por meio do aumento na detecção de ICAM-1 na superfície celular. Tal exposição também promoveu um aumento na expressão dos marcadores de ativação/maturação de células dendríticas pela linhagem THP-1. Paralelamente, o modelo epitelial 3D de co-cultura foi reconstruído em ALI agregando os quatro tipos celulares, para o qual a exposição aos aerossóis de anidrido maleico desencadeou aumento da produção de biomarcadores inflamatórios, bem como apoptose no compartimento epitelial e ativação das células monocíticas THP-1. Por fim, o uso da matriz brônquica suína descelularizada permitiu a reconstrução do modelo

epitelial utilizando as células Calu-3, as quais expressaram biomarcadores característicos das vias aéreas após 7 e 14 dias de cultivo em ALI. **Conclusão:** Os resultados demonstraram que os tipos celulares acima referidos estão certamente envolvidos na via de efeito adverso da alergia química respiratória, devendo ser considerados mediante o desenvolvimento de estratégias de avaliação de sensibilizantes de baixo peso molecular. Ademais, a integração dos diferentes tipos celulares envolvidos em um único modelo de co-cultura permitiu a obtenção de uma resposta tecidual global, bem como possibilitou a exposição a aerossóis de sensibilizantes mimetizando de forma mais fidedigna o contato do trato respiratório com agressores externos. Por fim, o uso da matriz brônquica descelularizada como *bioscaffold* para cultura 3D permitiu a obtenção de um modelo epitelial que apresentou características morfológicas e fenotípicas do epitélio brônquico humano, representando uma alternativa útil para avaliação da resposta pulmonar a toxicantes inalados. Portanto, trabalho fornece subsídio para a aplicação de biomarcadores inflamatórios e funcionais em nível celular, bem como de modelos oriundos de estratégias de bioengenharia para avaliação da sensibilização respiratória em âmbito pré-clínico.

**Palavras-chave:** Sensibilização respiratória; alergia química respiratória; novas abordagens metodológicas; toxicidade pulmonar; bioengenharia.

**Agradecimentos:** Laboratório Tox In, CNPq, CAPES e FINEP.

### Bioengineering strategies and New Approach Methodologies (NAMs) applied to the respiratory sensitization potential assessment of inhaled toxicants

Da Silva A. C. G.<sup>1</sup>; Valadares, M. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In vitro* (Tox In), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

**Introduction:** Respiratory sensitization encompasses a group of inflammatory diseases that manifest through airway hyperresponsiveness and airflow limitation. Although the chemical respiratory allergy (CRA) induced by Low Molecular Weight (LMW) sensitizers is a major concern, especially in terms of the regulatory framework, to date there are no methods available for preclinically addressing this toxicological outcome, as its mechanistic background is not fully understood at molecular or cellular levels. **Objectives:** The objective of this work is to apply several *in vitro* and *in chemico* approaches in order to address physiologically relevant aspects of human response to LMW respiratory allergens, aiming to contribute to the elucidation of this toxicant class mode of action and further evaluation regarding the preclinical stage. **Methodology:** First, we evaluated the interaction between LMW sensitizers and lung mucus by employing the mucin spectroscopic profile assessment in the presence and absence of seven chemical respiratory allergens. Then, we performed the evaluation of inflammatory and functional parameters in different respiratory tract cell types, including bronchial epithelial (BEAS-2B), lung fibroblasts (MRC-5), endothelial (EA.hy926) and monocytic cells (THP-1), after exposure to sub-cytotoxic concentrations of each sensitizer. Following the monolayer cell-based studies, we integrated the four mentioned cell types in a 3D bronchial co-culture model and exposed it to maleic anhydride aerosols in an air-liquid interface (ALI) for further evaluating inflammatory and functional tissue parameters. Finally, we also proposed the development of a bronchial epithelial model using the porcine decellularized bronchial wall as a bioscaffold, for which we evaluated different obtention methods, as well as the cell behavior when cultivated upon the obtained matrix. **Results/Discussion:** The results showed that some of the sensitizers evaluated interact with mucin, the main protein mucus component, but the toxicant-mucin complex formation does not seem to be a common feature of different chemical classes of allergens. At a cellular level, sensitizers promoted an increase in IL-8, IL-6, and IL-1 $\beta$  production in terms of the different evaluated cell types. It also impaired the MUC1 expression by bronchial cells BEAS-2B and activated endothelial cells (EA.hy926), thereby increasing the ICAM-1 surface detection. It has been also demonstrated an increased expression of dendritic cell activation/maturation surface biomarkers (CD86, HLA-DR and CD11b) in THP-1 monocytic cells after exposure to chemical allergens. In parallel, the 3D bronchial co-culture model was successfully reconstructed using by cultivating the four aforementioned cell types at an ALI, and maleic anhydride aerosols exposure increased the inflammatory biomarkers production, as well as the apoptosis in epithelial layer and THP-1 dendritic cell activation. Besides, the decellularized porcine bronchial matrix allowed the cultivation of Calu-3 cells, which regularly expressed the airway epithelium biomarkers after 7 and 14 days of cultivation in ALI. **Conclusion:** Taken together, our results showed that these

aforementioned cell types participate in the CRA Adverse Outcome Pathway and must be considered when developing testing strategies. The integration of different cell types in a unique co-culture model allowed the obtention of a global toxicant response, enabling the aerosol exposure, which emulates more realistically the airway contact with external aggressors. Finally, the 3D bronchial bioscaffold yielded the obtention of an epithelial model that morphologically and phenotypically resembles human airway epithelium, being a useful alternative for addressing lung response to inhaled toxicants. Thus, the work subsidizes the employment of inflammatory and functional biomarkers, as well as of bioengineering-derived *in vitro* models for addressing the respiratory sensitization potential of LMW allergens at a preclinical stage.

**Keywords:** Respiratory sensitization; chemical respiratory allergy; new approach methodologies; pulmonary toxicity; bioengineering.

**Acknowledgements:** Laboratório Tox In, CNPq, CAPES e FINEP.

## 1.1 – Sistema respiratório

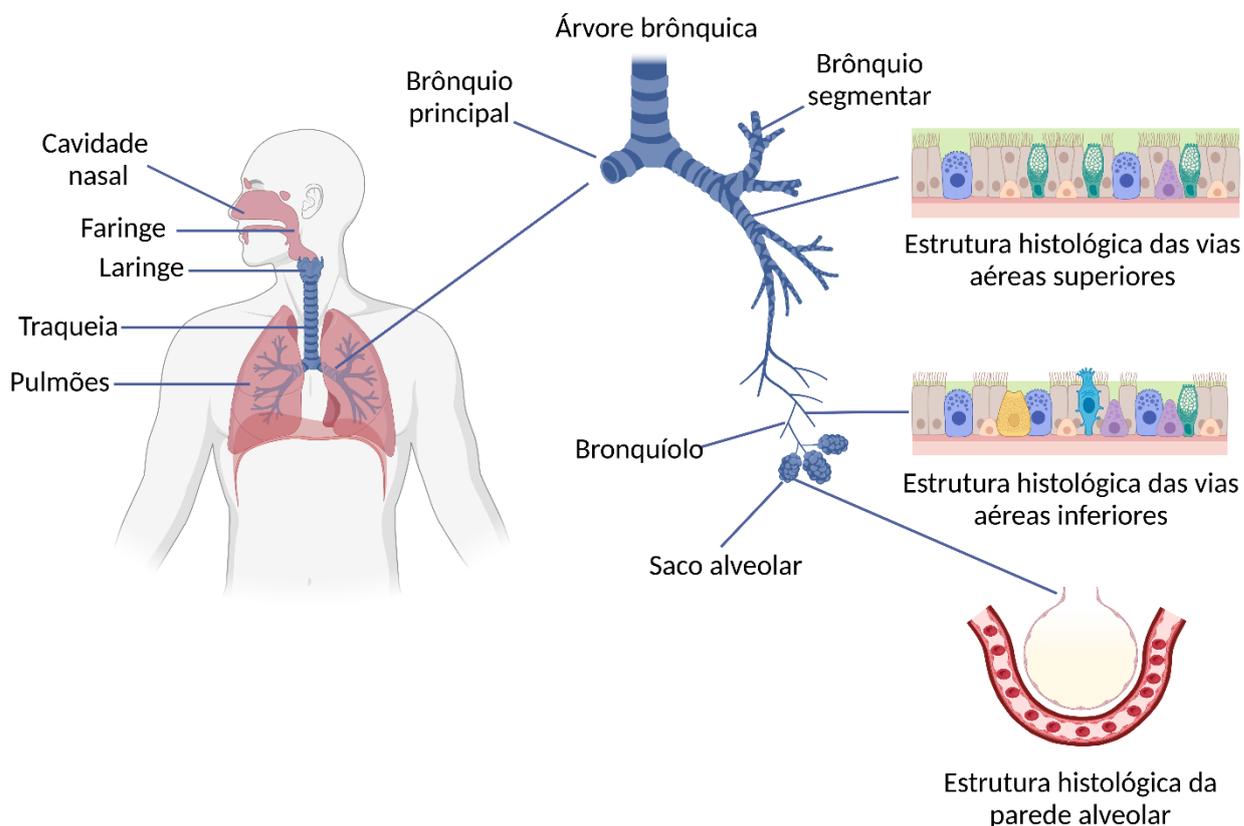
O sistema respiratório abrange um conjunto de órgãos e regiões anatômicas responsáveis pelo condicionamento do ar inalado, bem como pela realização de trocas gasosas visando a oxigenação sanguínea a nível pulmonar. Anatomicamente, esse sistema é dividido em vias aéreas superiores, as quais abrangem o nariz, laringe, faringe, e traqueia, bem como inferiores, que por sua vez incluem os brônquios principais direito e esquerdo, a árvore brônquica e os pulmões (Figura 1) (GOULD; DYER, 2011).

A entrada do ar no sistema respiratório se inicia pela cavidade nasal, a qual possui estrutura ósseo-cartilaginosa provida de pelos que atuam na filtragem inicial de partículas grandes, bem como uma extensa rede vascular que permite a umidificação e aquecimento do ar inalado. Posteriormente, o ar passa pela faringe e alcança a laringe, a qual é coberta pela cartilagem epiglótica e abriga as cordas vocais, que mediante vibração permitem a ocorrência do fenômeno da fala. Mais inferiormente, o ar percorre a traqueia, que consiste em um cilindro fibroso recoberto por semianéis de cartilagem hialina e se divide nos brônquios principais direito e esquerdo. Por fim, o ar alcança os brônquios segmentares, bronquíolos e os sacos alveolares, onde ocorrem as trocas gasosas propriamente ditas (Figura 1) (MCLAFFERTY et al. 2013).

A nível celular, o sistema respiratório possui um diverso repertório de células, os quais podem variar substancialmente considerando a região analisada. As vias aéreas superiores e inferiores são recobertas por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, que por sua vez é composto por células colunares ciliadas e não-ciliadas, bem como por células basais de renovação (Figura 2). As células não-ciliadas, por sua vez incluem células de Clara, calciformes, serosas e indeterminadas, as quais possuem a função principal de produção e secreção de muco, podendo também se diferenciar em células ciliadas mediante necessidade. Conforme a árvore brônquica se ramifica, o epitélio sofre algumas modificações, principalmente relacionadas à altura das células epiteliais, as quais tornam-se mais baixas partindo da traqueia até os bronquíolos terminais. A partir da região bronquiolar, é possível observar ainda uma camada de músculo liso que circunda a luz

brônquica, responsável por regular os processos de broncoconstrição e broncodilatação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SHAMI; EVANS, 2015).

Figura 1: Representação esquemática da anatomia e histologia do sistema respiratório humano.



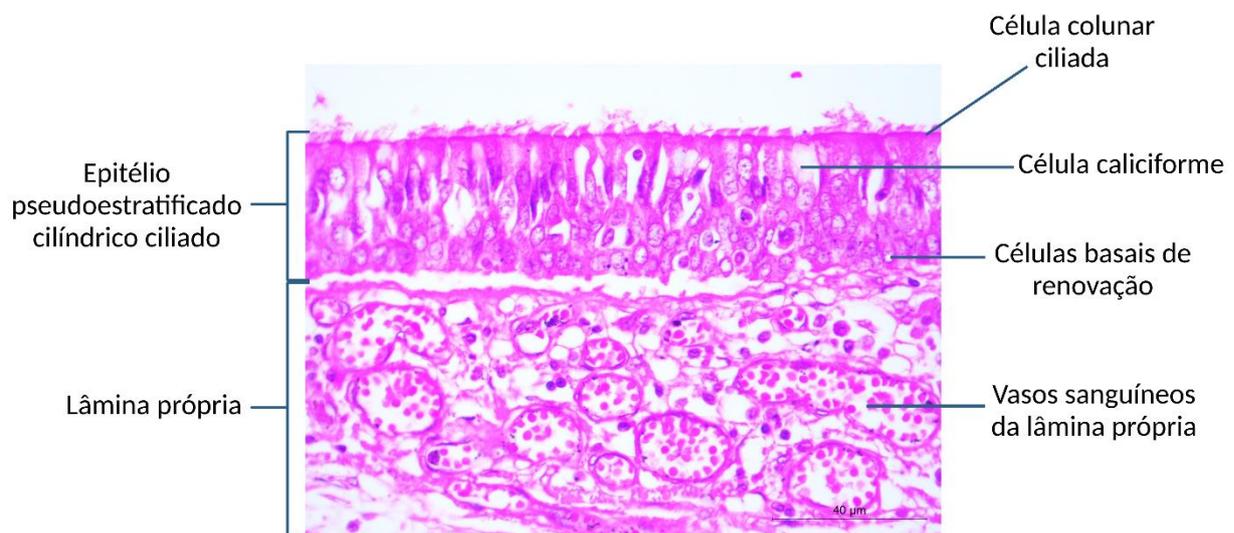
Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

A região alveolar, por sua vez, é recoberta por células epiteliais denominadas pneumócitos tipo I e II, onde as primeiras recobrem de 93 a 97% do parênquima pulmonar e mantêm estruturada a barreira hemato-aérea, e as segundas são responsáveis pela produção de surfactante pulmonar, o qual é composto basicamente por proteínas e fosfolípídeos e impedem o colapso da cavidade alveolar durante o processo de expiração, além de reduzir a tensão superficial destes diminuindo a força necessária na inspiração. Do outro lado da barreira, encontram-se as células endoteliais, as quais revestem os capilares pulmonares e estão em contato íntimo com o sangue circulante. No total, estima-se que o parênquima pulmonar possua em média 300 milhões de alvéolos, o que faz com que a superfície disponível para a ocorrência de trocas gasosas seja de aproximadamente  $140\text{m}^2$  (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Por esse motivo, a via

pulmonar é uma rota considerável de exposição a toxicantes inalados, uma vez que ao chegar à região alveolar estes podem ser extensivamente absorvidos e atingir a circulação sistêmica (NEWMAN, 2017).

Figura 2: Fotomicrografia representativa do epitélio de revestimento das vias aéreas, apontando os principais tipos celulares e estruturas histológicas encontrados nesse tecido. Coloração: hematoxilina/eosina. Aumento: 200x.



Fonte: SILVA, 2022.

Por se tratar de uma porta de entrada para diversos agressores externos, o sistema respiratório expressa constitutivamente diversos elementos da resposta imune inata, incorporando diversas barreiras biológicas que protegem o organismo contra agentes ambientais. As vias aéreas são recobertas por uma fina camada de muco, que associada aos cílios presentes na porção apical das células colunares formam o sistema de depuração mucociliar, fundamental para capturar e redirecionar partículas inaladas para a faringe, de modo a serem expelidas ou deglutidas. Partículas inferiores a 1 µm de diâmetro conseguem, contudo, adentrar a porção respiratória dos pulmões, onde podem ser neutralizadas por componentes solúveis (imunoglobulinas, componentes do sistema complemento e defensinas), bem como por células fagocíticas, que por sua vez são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (SHAMI; EVANS, 2015).

Além de micro-organismos patogênicos, substâncias químicas podem também ser inaladas e desencadear efeitos nocivos a nível local ou sistêmico, a depender de sua forma física (partículas, aerossóis ou vapores), bem como de suas propriedades físico-químicas. Esses fatores em conjunto determinam a profundidade que determinada substância adentra

na árvore brônquica, bem como a capacidade de ser depurada pela barreira respiratória ou adentrar a via sistêmica por meio da absorção ao nível da barreira alveolar (CLIPPINGER et al. 2018).

## 1.2 – Sensibilização respiratória

As doenças alérgicas respiratórias abrangem um conjunto de patologias desencadeadas pela exposição a alérgenos, caracterizadas pela fase de sensibilização do trato respiratório e, posteriormente, pela fase de eliciação da resposta alérgica frente a um novo contato com o agente sensibilizante. Clinicamente, a alergia respiratória pode se manifestar sob a forma de rinite alérgica, rino-conjuntivite, sinusite, asma e alveolite extrínseca alérgica (HOLGATE; POLOSA, 2008; SEED et al. 2015).

No contexto das doenças pulmonares quimicamente induzidas, a sensibilização respiratória pode ser definida como o primeiro estágio, o qual consiste em uma reação de hipersensibilidade mediada pelo sistema imune após exposição a uma determinada substância. A alergia química respiratória, por sua vez, acontece mediante a ocorrência de exposições repetidas do indivíduo a um dado alérgeno químico, resultando na maioria das vezes em asma e rinite, as quais frequentemente podem ser associadas ao ambiente ocupacional (LUMMUS et al. 2011).

Dentre as doenças respiratórias alérgicas induzidas por substâncias químicas, a asma é a principal manifestação clínica associada com aumento da morbidade. Estima-se que a asma quimicamente induzida represente de 10 a 20% dos casos de hiperresponsividade brônquica em indivíduos adultos, a qual tem sido associada principalmente à exposição ocupacional de trabalhadores, resultando nos perfis clínicos de asma exacerbada pelo ambiente de trabalho (*Work-exacerbated asthma – WEA*) e asma ocupacional (AO) (MAESTRELLI et al. 2020). Clinicamente, as manifestações da WEA e AO abrangem desde sintomas leves que incluem tosse seca periódica e aumento do esforço respiratório no trabalho, até sintomas mais graves como sibilos, tosses prolongadas, aperto no peito, dispneia e falta de ar que podem persistir mesmo fora do ambiente ocupacional (LOMBARDO; BALMES, 2000).

Os alérgenos respiratórios causadores desse conjunto de doenças podem ser estruturalmente classificados em dois grandes grupos, compreendendo os sensibilizantes de alto peso molecular (*HMW – High Molecular Weight*) e de baixo peso molecular (*LMW – Low Molecular Weight*). Os alérgenos HMW possuem peso molecular superior a 10.000 Da, são em sua maioria derivados de proteínas e geralmente desencadeiam uma resposta

imune mediada por IgE. Os alérgenos de baixo peso molecular, por outro lado, possuem estrutura química definida com peso molecular inferior a 1000 Da (LUMMUS et al. 2011). Ambos os tipos de sensibilizantes respiratórios têm sido frequentemente associados à ocorrência de asma ocupacional em indivíduos que se expõem rotineiramente aos mesmos no ambiente de trabalho, de modo que evidências apontam para o fato de que a asma induzida por alérgenos de baixo peso molecular pode ser mais severa do que a induzida por sensibilizantes de alto peso molecular, culminando em um maior grau de hiperresponsividade brônquica (MECA et al. 2016).

Nesse contexto, os sensibilizantes de baixo peso molecular são os agentes de maior preocupação no que se diz respeito à avaliação de toxicidade respiratória. Esses toxicantes podem atuar por meio de mecanismos imunológicos e não-imunológicos, de forma que os primeiros atuam por meio da sensibilização e ativação de mecanismos mediados pelo sistema imune, enquanto os segundos promovem efeitos irritativos sobre o trato respiratório, levando a uma responsividade reflexa dos pulmões (PEMBERTON et al. 2021). Não obstante, independentemente do tipo de mecanismo de ação, os sensibilizantes respiratórios LMW são classificados como substâncias de alto nível de preocupação (do inglês *Substances of Very High Concern – SVHC*) pela agência europeia de substâncias químicas (*European Chemical Agency - ECHA*), de modo que a legislação do REACH europeu estabelece que as normas para classificação e rotulagem dessas substâncias devem seguir os mesmos critérios adotados para agentes carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (EC 2006; ECHA 2017). Dentre as principais classes químicas de compostos identificados como sensibilizantes respiratórios, estão incluídos anidridos ácidos, diisocianatos, sais halogenados de platina, acrilatos, persulfatos e alguns corantes reativos (KIMBER et al. 2014; ARTS 2020).

Apesar dos restritos requerimentos regulatórios acerca dos sensibilizantes pulmonares, até o momento não existem metodologias validadas para avaliação pré-clínica dessa classe de toxicantes. Atualmente, menos de uma centena de compostos foram completamente caracterizados como sensibilizantes respiratórios, de forma que a grande maioria das classificações advieram de observações epidemiológicas e relatos de asma quimicamente induzidas em trabalhadores expostos aos mesmos (ARTS 2020). Contudo, tais dados devem ser avaliados de forma extensivamente cuidadosa, de modo a se considerar o histórico prévio de doenças/exposição a xenobióticos de cada indivíduo, bem como associar avaliações clínicas e laboratoriais de parâmetros que permitam o estabelecimento

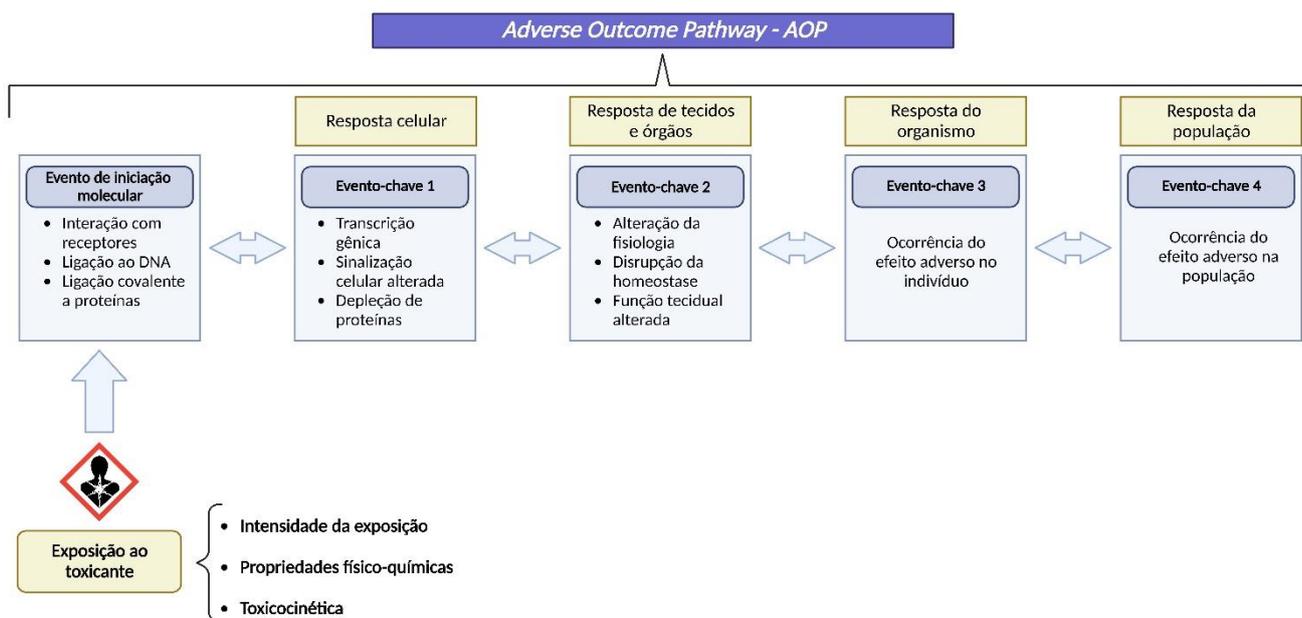
denexo causal entre o desenvolvimento da patologia e a exposição a determinado toxicante (PEMBERTON et al. 2021).

### 1.2.1 – Via de efeito adverso da sensibilização respiratória

Por definição, as vias de efeito adverso, também chamadas de AOP (do inglês *Adverse Outcome Pathway*) descrevem sequências lógicas de eventos biológicos sucessivos que são iniciados após a exposição a um determinado toxicante, os quais estão interconectados entre si e resultam em um desfecho toxicológico específico (OECD, 2018). Em outras palavras, os AOPs descrevem como determinados eventos-chave se correlacionam entre si desde a perturbação inicial de um sistema biológico até a ocorrência de um desfecho de toxicidade específico (OECD, 2018). Os eventos-chave, por sua vez, podem ser definidos como respostas biológicas mensuráveis que são desencadeadas pelo contato inicial com o agente tóxico, os quais são essenciais para a progressão do efeito adverso e, conseqüentemente, para a ocorrência do desfecho de toxicidade avaliado (FITZGERALD, 2020). Conforme descrito na Figura 3, para que um efeito adverso aconteça, é mandatória a ocorrência de um evento de iniciação molecular (MIE – *Molecular Initiation Event*), que consiste na interação inicial do toxicante com um alvo molecular específico, o qual é seguido por sucessivos eventos-chave que geralmente envolvem respostas celulares específicas e culmina em uma resposta biológica mensurável a nível tecidual (FIZGERALD, 2020; SPINU et al. 2020).

A descrição de AOPs para diferentes desfechos toxicológicos específicos se tornou a base da toxicologia experimental e mecanística contemporânea, a qual também tem sido chamada por alguns autores de “Toxicologia do Século XXI”. Desde a publicação do relatório intitulado “*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*” pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos em 2007 (US NRC, 2007), que estimula a adoção de estratégias inovadoras de avaliação toxicológica em substituição aos modelos animais tradicionalmente empregados para essa finalidade, vários tem sido os avanços feitos no campo da elucidação dos mecanismos de ação que compõem as vias de efeito adverso. Até o momento, mais de 400 AOPs estão em construção na base de dados AOP-Wiki da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), os quais incluem distintos desfechos toxicológicos (AOP Wiki, 2022).

Figura 3: Representação esquemática das etapas que constituem as vias de efeito adverso após exposição a toxicantes



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

A exemplo de como a elucidação de AOPs pode contribuir para a substituição dos modelos animais por métodos mais preditivos em toxicologia, bem como na tomada de decisões nos âmbitos científico e regulatório, vale ressaltar brevemente o histórico da avaliação de sensibilização dérmica de produtos. Os primeiros ensaios propostos para avaliação do potencial de alergenicidade cutânea eram baseados no uso de roedores (DE ÁVILA, LINDSET, VALADARES, 2019). O teste de Buehler (BT) e o *Guinea Pig Maximisation Test* (GPMT) têm como princípio a administração tópica/intradérmica do material teste em porcos-da-Índia, a qual é seguida por um período de descanso de 10-14 dias, com uma sucessiva exposição, de modo que o desfecho avaliado são as reações cutâneas na pele dos animais, incluindo principalmente reações edematosas e eritematosas (OECD, 2022a). Por outro lado, o *Local Lymph Node Assay* (LLNA) se baseia na aplicação da substância-teste na região auricular de camundongos por três dias consecutivos, de modo que no sexto dia de estudo é feita a mensuração da proliferação celular nos linfonodos auriculares drenantes dos animais. Com base no perfil de proliferação das células do grupo tratado em relação ao grupo controle, é possível calcular o Índice de Estimulação (SI) do material-teste, o qual é considerado alergênico caso induza um valor  $\geq 3$  (OECD, 2010).

Em 2012 a OECD publicou o documento N<sup>o</sup>. 168 que pontua as evidências científicas para a descrição dos eventos-chave da via de efeito adverso da sensibilização dérmica. Conforme descrito no documento, os eventos-chave da dermatite de contato alérgica induzida por substâncias químicas incluem 1) ligação covalente de substâncias eletrofílicas a centros nucleofílicos das proteínas da pele, 2) produção de mediadores inflamatórios e modulação transcricional de elementos da resposta antioxidante por queratinócitos, 3) ativação e migração de células dendríticas e 4) ativação e proliferação de linfócitos-T (OECD, 2014). A elucidação dos mecanismos supracitados possibilitou o desenvolvimento de métodos *in chemico* e *in vitro* para avaliação pré-clínica de substâncias isoladas e misturas, os quais foram validados por agências reguladoras internacionais e hoje integram os guias de teste 442C (evento-chave 1) (OECD, 2022b), 442D (evento-chave 2) (OECD, 2022c) e 442E (evento-chave 3) (OECD, 2022d) da OECD. Apesar dos numerosos avanços que tais metodologias proporcionaram para avaliação de toxicidade cutânea de produtos, é importante salientar que um único ensaio não é capaz de substituir os testes em animais se utilizado isoladamente. Portanto, em 2021 a OECD publicou o guia No. 497, que dispõe sobre abordagens definidas para avaliação de alergenicidade utilizando os guias de teste acima mencionados (OECD, 2021). De acordo com o documento, a integração de três ensaios *in chemico/in vitro* que levem à obtenção de pelo menos dois ensaios concordantes, estratégia “2 out 3”, permite a identificação de sensibilizantes com exatidão global superior ao ensaio *in vivo* de LLNA (OECD, 2021). Apesar de algumas limitações para avaliação da potência de alérgenos químicos, o uso de tais metodologias permite a substituição ou, em casos específicos, uma redução considerável do número de animais, gerando resultados com maior relevância fisiológica para seres humanos.

A exemplo do AOP de alergenicidade cutânea, em 2017 Sullivan e colaboradores propuseram uma via de efeito adverso baseada em evidências para a sensibilização respiratória. Conforme descrito por tais autores, assim como ocorre para a dermatite de contato alérgica, a sensibilização do trato respiratório advém da ocorrência de quatro eventos-chave, incluindo 1) ligação covalente a proteínas, 2) produção de citocinas inflamatórias por elementos celulares da imunidade inata, 3) ativação e migração de células dendríticas e 4) proliferação e polarização de linfócitos T (SULLIVAN et al. 2017).

O processo de haptização constitui o evento de iniciação molecular da sensibilização pulmonar e consiste na ligação covalente do toxicante com uma biomolécula, de modo que o complexo toxicante-peptídeo passa a ser reconhecido pelo sistema imune (LEPOITTEVIN, 2006). A capacidade de um sensibilizante em estabelecer uma ligação

permanente com subunidades proteicas está associada, principalmente, ao grau de eletrofilicidade. No caso dos sensibilizantes respiratórios, os mesmos promovem predominantemente reações de acilação, substituição nucleofílica alifática, substituição nucleofílica aromática, adição de Michael e formação de bases de Schiff com alvos protéicos (ENOCH et al. 2012). Apesar de alguns autores afirmarem a existência de uma predileção reacional de sensibilizantes respiratórios por resíduos de lisina, enquanto os dérmicos reagiriam preferencialmente com resíduos de cisteína (HOPKINS et al. 2005; LALKO et al. 2013), estudos recentes demonstram que tal regra aplica-se apenas a algumas classes químicas, não estando esse mecanismo atrelado à diferenciação de alérgenos pulmonares e cutâneos (KRUTZ et al. 2021). Além disso, vale ressaltar que os sensibilizantes podem atuar diretamente sobre alvos proteicos, ou requererem ainda ativação prévia para a formação do complexo hapteno-proteína. Os chamados pré-haptenos são convertidos abioticamente a haptenos por fatores físico-químicos, incluindo radiação ultravioleta, temperatura, exposição ao oxigênio, enquanto os pró-haptenos requerem metabolização para serem ativados e se ligarem às biomoléculas (LEPOITTEVIN, 2006).

Após a ocorrência do evento de iniciação molecular, o segundo evento-chave proposto foi a resposta inflamatória de elementos da resposta imune inata em decorrência da formação do complexo toxicante-proteína. Contudo, diferentemente da via de efeito adverso da sensibilização dérmica onde sabe-se que a via Nrf2-Keap1 é predominantemente regulada em queratinócitos após exposição a sensibilizantes cutâneos (HELOU et al. 2019), no caso de alérgenos respiratórios ainda não estão estabelecidos os mecanismos predominantes que regulam a resposta imune inata frente tal exposição (SULLIVAN et al. 2017). Considerando que o sistema respiratório é a porta de entrada do ar inalado para o organismo, o qual pode trazer consigo uma ampla gama de substâncias nocivas e patógenos, e tecido pulmonar expressa constitutivamente diversos elementos humorais e celulares da resposta imune inata visando a proteção contra agressores externos, como por exemplo proteínas de defesa (mucinas, defensinas e colectinas) e citocinas inflamatórias produzidas por células epiteliais (IL-6, CXCL8, IL-1 $\beta$ , GM-CSF e G-CSF) (PARKER; PRINCE, 2011; HARTL et al. 2018). Nesse contexto, o epitélio de revestimento desempenha um papel primordial no reconhecimento inicial de diferentes tipos de dano induzidos na árvore brônquica, o qual ocorre principalmente por diferentes classes de receptores celulares que atuam no reconhecimento de padrões moleculares específicos, sendo eles os receptores *toll-like* (TLRs) e os da família *nucleotide-binding*

*domain leucine-rich repeat containing receptor* (NLRs). Esses receptores atuam no reconhecimento de Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) e também de Padrões Moleculares Associados a Perigo (DAMPs), os quais permitem o reconhecimento de micro-organismos patogênicos e elementos oriundos de dano tecidual (MARTIN; FREVERT, 2005; PARKER; PRINCE, 2011; HARTL et al. 2018).

No contexto da via de efeito adverso da sensibilização pulmonar, acredita-se que a ativação de tais elementos celulares da resposta imune inata possua uma contribuição determinante para o microambiente inflamatório que desencadeia a alergia química respiratória, dado que tais estímulos podem, por exemplo, modular a ativação de células dendríticas, interferindo na posterior polarização da resposta imune no momento da apresentação antigênica (HOLGATE et al. 2012). Apesar de a grande maioria dos dados estarem limitados a poucas classes químicas e a um restrito número de tipos celulares avaliados, existem descritos na literatura relatos da influência de sensibilizantes pulmonares químicos sobre elementos da resposta imune inata.

O principal modelo celular empregado para tais avaliações são as células epiteliais do trato respiratório, para os quais já foram documentadas alterações induzidas por alérgenos químicos incluindo aumento na produção de IL-8 (LEE et al. 2003; OGAWA ET AL., 2006; JIAO ET AL., 2021), ativação da transcrição de genes regulados pelo fator Nrf-2 (REMY et al. 2014), alterações na morfologia ciliar (LANGE et al. 1999), ativação das vias da caspase-9 e PTEN (VERSTRAELEN et al. 2009) e mudanças nas vias de sinalização do citoesqueleto (DIK et al. 2015). Não obstante, apesar da função primordial da porção epitelial na resposta a agressores, a fisiopatologia da alergia química respiratória indubitavelmente envolve outros tipos celulares que participam tanto da fase de iniciação quando da fase de elicitação, para os quais o efeito de alérgenos químicos respiratórios ainda não está descrito (VERSTRAELEN et al. 2009).

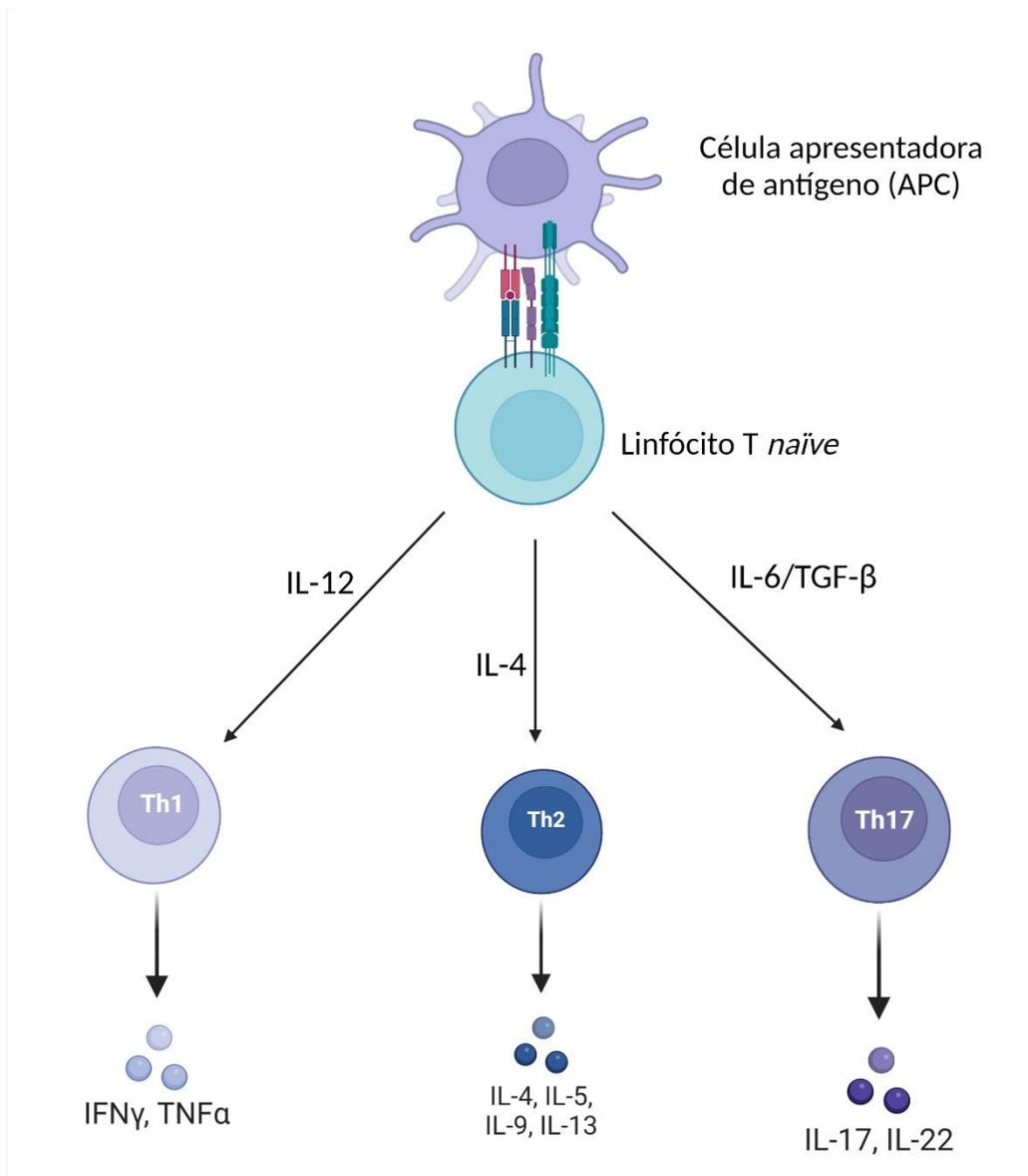
O terceiro evento-chave proposto para a sensibilização respiratória consiste na ativação/migração de células dendríticas. As células dendríticas (CDs) consistem em populações celulares derivadas da medula óssea que podem ser encontradas no sangue circulante, bem como em tecidos periféricos e órgãos linfoides, capazes de reconhecer e processar DAMPs e PAMPs para posterior apresentação a linfócitos T *naive* via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), além de expressarem receptores de co-estimulação (CD54, CD80 e CD86). As CDs constituem o principal elemento que liga a imunidade inata à adaptativa, sendo um componente determinante na polarização da resposta dos linfócitos T para um perfil Th1, Th2 ou Th17 (COLLIN; BIGLEY, 2018).

No que tange os mecanismos da dermatite de contato alérgica, a participação da CDs já foi detalhadamente estudada, de modo que os principais *endpoints* mensuráveis que refletem a participação desse tipo celular nesse processo são o aumento na produção de IL-8 e a expressão dos receptores de superfície com função co-estimulatória CD86 e CD54 em resposta à exposição a sensibilizantes dérmicos (MITJANS ET AL., 2008; MITJANS ET AL., 2010; OECD, 2022d). Para os sensibilizantes respiratórios, por outro lado, também já foram documentadas alterações no estado de maturação/ativação em diferentes modelos de CDs, incluindo aumento na expressão de CD86/CD54 (SAKAGUCHI ET AL., 2009; ASHIKAGA ET AL., 2010), modulação transcricional de genes relacionados à fosforilação oxidativa (FORRERYD et al. 2015), alterações no balanço de oxido-redução (FERREIRA et al. 2018), mudanças no perfil fosfolipídico (MARTINS et al. 2015) e ativação transcricional de vias relacionadas à produção de citocinas inflamatórias (ZELLER et al. 2018).

O quarto e último evento-chave que subsidia o AOP da alergia química respiratória abrange a ativação, proliferação e polarização de linfócitos-T. Uma vez ativadas, as CDs migram para linfonodos drenantes que circundam o sítio de contato com o alérgeno e, nesses órgãos linfoides, realizam a apresentação antigênica juntamente com mecanismos co-estimulatórios para linfócitos-T *naïve*. Com base na intensidade da estimulação do receptor das células T (TCR), nas citocinas produzidas pela célula apresentadora de antígeno, bem como no microambiente onde a apresentação antigênica ocorre, os mesmos podem se diferenciar em subpopulações denominadas T *helper* 1 (Th1), T *helper* 2 (Th2) ou T *helper* 17 (Th17), os quais tornar-se-ão as células efetoras das imunopatologias de cunho alérgico (LUMMUS et al. 2015; LAO et al. 2022). As células Th1 produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ) como principal citocina efetora e atuam promovendo a produção de imunoglobulinas por linfócitos B que estejam associadas à resposta fagocítica na relação patógeno-hospedeiro (ROMAGNANI, 2004). Os linfócitos Th2, por sua vez, atuam por meio da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e estão intimamente associados à fisiopatologia da asma. As citocinas IL-4 e IL-13 têm sido associadas à mudança da classe de imunoglobulinas por linfócitos B de IgM para IgE, enquanto a IL-5 promove diferenciação, recrutamento e ativação de eosinófilos, contribuindo diretamente para os achados patológicos eosinofílicos no pulmão asmático (LAMBRECHT et al. 2019). As células Th17, por outro lado, atuam principalmente no recrutamento de neutrófilos, o qual pode ser direto ou indireto mediante a produção de IL-8 ou estimulando a produção dessa quimiocina por células estruturais. Ademais, tais células estão também envolvidas no remodelamento das vias aéreas por

meio da indução proliferativa de fibras musculares lisas e fibroblastos (LUO et al. 2022) (Figura 4).

Figura 4: Mecanismo de apresentação antigênica aos linfócitos T *naïve*, bem como diferenciação nas diferentes subpopulações efetoras Th1, Th2 e Th17.



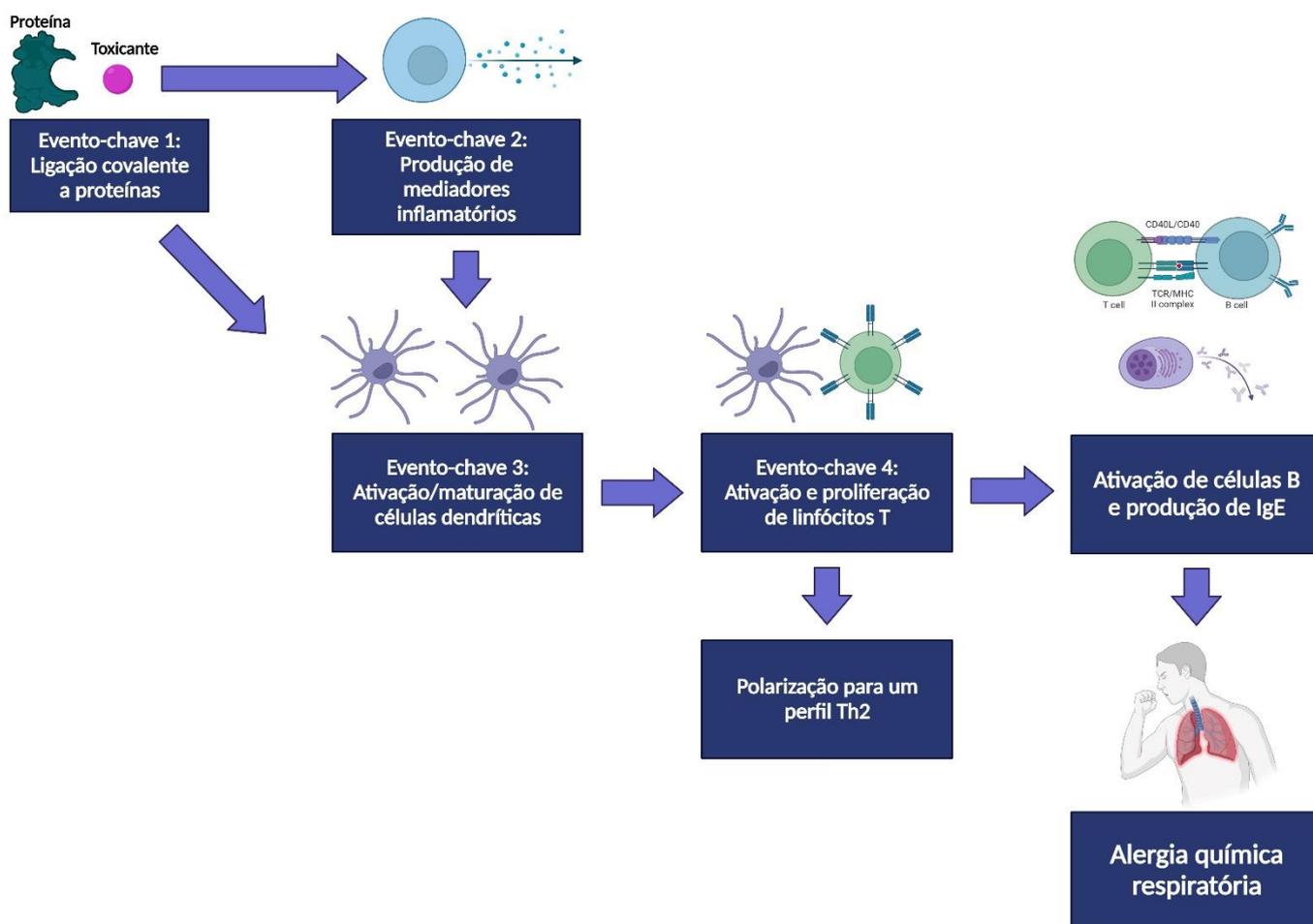
Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

No contexto da avaliação da resposta alérgica quimicamente induzida, sabe-se que os sensibilizantes de contato polarizam uma resposta Th1, enquanto os sensibilizantes respiratórios desencadeiam um perfil Th2. Contudo, os mecanismos por meio dos quais essa distinção acontece a nível de células T efetoras não está totalmente elucidado até o

momento, o qual pode estar associado ao microambiente presente no momento da apresentação antigênica, bem como aos estímulos e co-estímulos fornecidos pelas células CDs aos linfócitos-T *naive* (SULLIVAN et al. 2017). Não obstante, esse se mantém o evento-chave mais desafiador para a elucidação da via de efeito adverso da alergia química respiratória, uma vez que exposições dérmicas também elicitam respostas pulmonares a alérgenos respiratórios (Arts, 2020) (Figura 5).

Figura 5: Representação esquemática da via de efeito adverso da sensibilização respiratória, construída com base em evidências e proposta por Sullivan et al. (2017).



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

Apesar dos numerosos avanços na compreensão dos mecanismos do processo de sensibilização e indução de alergia química respiratória obtidos após a proposição do AOP baseado em evidências por Sullivan e colaboradores (2017), até o momento não existem

métodos validados para a avaliação desse desfecho toxicológico no âmbito pré-clínico. Uma das principais razões para justificar esse cenário reside no fato de os mecanismos imunológicos que desencadeiam a sensibilização do trato respiratório não estarem completamente elucidados (Arts, 2020).

Apesar de ter sido construído com base no AOP de sensibilização dérmica, para o qual os eventos-chave estão completamente descritos, existem pontos de divergência que fazem com que sensibilizantes respiratórios não sejam inequivocadamente identificados em ensaios para identificação de sensibilizantes dérmicos (BASKETTER et al. 2017). Em vista dos eventos-chave propostos, os aspectos divergentes existentes entre duas vias de efeito adverso incluem: (1) os alvos moleculares dos sensibilizantes respiratórios diferem daqueles dos sensibilizantes de contato; (2) não existem informações suficientes sobre a ativação de elementos da resposta imune inata por alérgenos respiratórios; (3) apesar de ambos os alérgenos ativarem células dendríticas, ainda não se sabe quais subpopulações e quais estímulos são produzidos na indução por sensibilizantes respiratórios; (4) os mecanismos que favorecem a polarização de uma resposta Th2 por alérgenos respiratórios em detrimento de uma resposta Th1, como acontece com alérgenos de contato, também não estão compreendidos, estando provavelmente acoplados ao evento-chave 3, onde as células dendríticas provavelmente produzem co-estímulos que conduzam a esse perfil de resposta (KIMBER; POOLER; BASKETTER, 2018).

### **1.3 – Modelos experimentais para avaliação do potencial de sensibilização pulmonar de toxicantes**

#### **1.3.1 – Modelos *in vivo***

Tendo em vista que o ensaio de LLNA se baseia na proliferação de linfócitos T após exposição a substâncias alergênicas, alguns autores têm proposto a utilização desse método também para identificação de alérgenos respiratórios, além do original domínio de aplicação do mesmo para classificação de sensibilizantes dérmicos. Apesar do método de LLNA permitir a identificação de sensibilizantes pulmonares, os quais promovem um resultado de SI superior a 3, o mesmo não permite a diferenciação de alérgenos respiratórios e de contato possuindo, portanto, uma sensibilidade de 100% mas uma especificidade de 0% (DEARMAN; BASKETTER; KIMBER, 2013).

Considerando que o método convencional de LLNA avalia substâncias expostas pela via cutânea, em 2008 Arts e colaboradores propuseram uma adaptação desse ensaio, no qual realizaram a exposição dos animais a sensibilizantes pela via inalatória, sendo denominado LLNA respiratório (rLLNA) (ARTS et al. 2008). Com o objetivo de avaliar a influência da via de exposição tanto no potencial de indução quanto na potência da resposta imune desencadeada por alérgenos químicos, os autores verificaram nesse método que, tanto sensibilizantes respiratórios quanto de contato levaram a um aumento na proliferação celular em linfonodos drenantes após exposição pela via inalatória. O estudo demonstrou, portanto, que ainda a alteração da rota de exposição não permite uma distinção fidedigna entre as duas classes de toxicantes (ARTS et al. 2008).

Dadas as limitações dos métodos validados para diferenciação dos perfis de resposta de alérgenos de contato e respiratórios, outras abordagens também relatadas na literatura para avaliação de sensibilizantes pulmonares incluem a instilação intranasal ou intratraqueal do toxicante, bem como a sensibilização pela via cutânea, com posterior mensuração nos níveis séricos de IgE e também do perfil de citocinas inflamatórias produzidos após exposição. Apesar de ainda não estar claro o papel da IgE no perfil clínico da alergia química respiratória, algumas classes de sensibilizantes respiratórios promovem um aumento nos níveis plasmáticos desse biomarcador em alguns modelos animais, o qual pode estar diretamente relacionado a um perfil de resposta Th2 como ocorre nas reações de hiper-reatividade pulmonar (HILTON et al. 1995; POTTER et al. 1995; MORI et al. 2012). Por outro lado, alterações no perfil de citocinas inflamatórias no sobrenadantes de células coletadas de linfonodos drenantes demonstram que sensibilizantes respiratórios podem promover aumento na produção de marcadores relacionados ao perfil Th2 (IL-4 e IL-10), enquanto alérgenos de contato induzem aumento na produção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez se relaciona com o perfil Th1. Entretanto, além de tais alterações terem sido detectadas apenas para sensibilizantes fortes, tal produção também possui uma baixa resolução para diferenciar ambas as classes de toxicantes, visto que alguns dos alérgenos pulmonares (Anidrido Trimetílico) também induziram um aumento da produção de IFN- $\gamma$  (DEARMAN et al. 1999; VAN OCH et al. 2002). Aumentos nos níveis de citocinas no fluido broncoalveolar (BAL) de animais desafiados por instilação traqueal com sensibilizantes respiratórios também já foram relatados, sendo observados aumentos expressivos para as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN-  $\gamma$  (MORI et al. 2012).

Apesar de permitirem a identificação de sensibilizantes respiratórios, os modelos *in vivo* apresentam limitações para a diferenciação dessa classe de toxicantes quando

comparada aos alérgenos de contato. Mesmo com a alteração da rota de exposição pela via inalatória, essa abordagem requer o uso de equipamentos especializados e de alto custo. Considerando as vias intratraqueal e intranasal, o fato de a grande maioria dos sensibilizantes ser pouco hidrossolúveis demanda o uso de sistemas de solubilização/dispersão que podem ser por si só nocivos ao trato respiratório do animal, resultando em uma resposta inflamatória no local da administração (ARTS; KUPER, 2007). Além disso, considerando uma abordagem translacional, os resultados obtidos com modelos de roedores para a predição de efeitos sobre o sistema respiratório humano são de pouca capacidade preditiva. Várias são as disparidades anatômicas e fisiológicas entre o sistema respiratório de ambas as espécies, as quais incluem o padrão de ramificação brônquica, a proporção dos diferentes tipos celulares, o modo e taxa de respiração, além das diferenças e especificidades no perfil de resposta imunológica (CLIPPINGER et al. 2017).

### 1.3.2 – Novas abordagens metodológicas (NAMs) aplicadas à avaliação de toxicidade pulmonar

Dadas as limitações preditivas e éticas atribuídas aos modelos animais classicamente empregados para avaliações toxicológicas, as chamadas Novas Abordagens Metodológicas, ou do inglês *New Approach Methodologies* (NAMs), emergiram como um conjunto de técnicas e ferramentas que visam substituir os modelos animais tradicionalmente empregados para essa finalidade. As NAMs abrangem ensaios *in chemico*, *in silico*, *ex vivo* e *in vitro*, os quais podem ser associados a técnicas de biologia celular e molecular, métodos analíticos robustos, ferramentas de transcriptômica, proteômica e metabolômica, bem como análises de bioinformática, as quais permitem a obtenção de dados mecanísticos robustos acerca do modo de ação tóxica de substâncias químicas e misturas. Tais resultados devem ser analisados de maneira conjunta com dados já existentes, possibilitando a tomada de decisão mediante a avaliação de risco de novos produtos (ECHA, 2016).

Nas duas últimas décadas, as NAMs têm sido cada vez mais adotadas e aceitas do ponto de vista regulatório para registro de produtos por agências regulatórias de todo o mundo (AVILA et al. 2020; PISTOLLATO et al. 2021). Por exemplo, a agência norte-americana de proteção ambiental (*Environmental Protection Agency* -EPA) declarou que está mediando esforços para banir o uso de animais vivos até o ano de 2035 em estudos pré-clínicos (GRIMM, 2019). Os desfechos toxicológicos que mais avançaram no uso de

tais metodologias para fins de registro foram alergenicidade cutânea e irritação/corrosão ocular, para os quais foram publicados pela OECD guias de teste contendo estratégias de avaliação integrada para classificação de produtos sem o uso de modelos animais (OECD, 2021; OECD, 2022e). Contudo, alguns desafios ainda permeiam o desenvolvimento de tais metodologias considerando outros *endpoints* toxicológicos, como por exemplo o uso de dados oriundos de modelos animais como referência para padronização e validação das NAMs podem subestimar sua capacidade preditiva, uma vez que muitos dos dados experimentalmente obtidos em animais não possuem relevância fisiológica considerando a resposta humana (VAN DER ZALM et al. 2022).

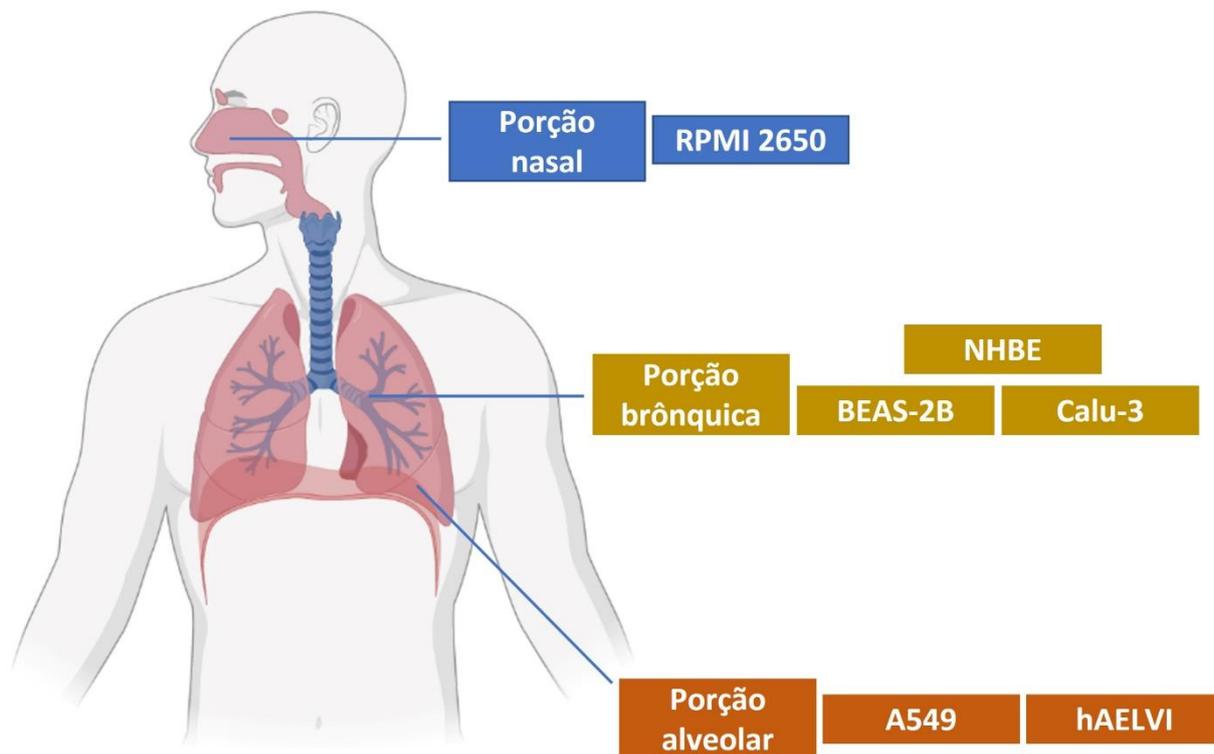
Nesse contexto, o principal objetivo é estabelecer parâmetros de predição que permitam a extrapolação direta dos dados obtidos empregando-se NAMs com a resposta humana. Para tal, os principais critérios que garantem a aplicabilidade de uma abordagem de avaliação inovadora em toxicologia incluem (1) domínio de aplicação bem definido, (2) relevância biológica do modelo proposto, (3) caracterização técnica e descrição detalhada da metodologia de avaliação. Tais requisitos associados a um tratamento íntegro e transparente dos resultados obtidos garantem a proposição de métodos preditivos para a avaliação de risco e tomada de decisões por reguladores e regulados (VAN DER ZALM et al. 2022).

No contexto da avaliação de toxicidade pulmonar, até o momento não existem ferramentas validadas para essa finalidade. Contudo, estão descritos na literatura vários métodos que permitem a mensuração de efeitos de toxicantes sobre o trato respiratório, os quais objetivam emular diferentes aspectos da fisiologia respiratória humana que se correlacionam com a ação nociva de toxicantes inalados. Nessa seção, serão descritas as principais ferramentas de avaliação de toxicidade pulmonar que empregam NAMs.

#### 1.3.2.1 – Modelos de cultura celular em monocamada

A cultura de células é uma das ferramentas mais utilizadas para a realização de estudos que avaliam diferentes parâmetros da função celular a nível de triagem de efeitos. Até o momento, vários são os tipos celulares empregados para avaliação de compostos terapêuticos e tóxicos a nível pulmonar *in vitro*, incluindo linhagens de origem tumoral, células primárias e imortalizadas. Dada a multicompartimentalidade do sistema respiratório, atualmente existem linhagens celulares epiteliais isoladas dos diferentes segmentos deste, incluindo as porções nasal (RPMI-2650), brônquica (Calu-3, BEAS-2B e 16HBE14o-) e alveolar (A549 e hAELVi) (HIEMSTRA et al. 2018) (Figura 6).

Figura 6: Principais linhagens celulares epiteliais comercialmente disponíveis oriundas dos diferentes segmentos do sistema respiratório.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

As linhagens contínuas, de origem tumoral ou não, apresentam consideráveis vantagens em relação às células primárias, apresentando um maior índice de proliferação, a ausência de variabilidade entre doadores, possuem um cultivo de baixo custo relativo e são adequadas para aplicação em estratégias de *high-throughput screening* (HTS) (HIEMSTRA et al. 2018). As principais representantes desse grupo são as células da porção brônquica Calu-3, de origem tumoral, e BEAS-2B, imortalizada por adenovírus SV40, e alveolar A549, também de origem tumoral. Tais modelos já foram empregados para avaliação de diversas alterações celulares induzidas por toxicantes inalados, incluindo produção de biomarcadores inflamatórios (HE et al. 2020), aumento na expressão de proteínas do muco (MÉAUSOONE et al. 2020), aumento no estresse oxidativo intracelular

(YAN et al. 2021; WANG et al. 2019), perda da viabilidade mitocondrial (WANG et al. 2019) e ativação transcricional de fatores relacionados ao dano celular inflamatório (ATTAFI et al. 2020).

Outro modelo celular que também pode ser aplicado para tal finalidade são as células primárias isoladas diretamente das vias aéreas respiratórias, as quais podem ser obtidas por meio de biópsias ou broncoscopia, bem como de fragmentos teciduais obtidos *post mortem* ou ainda de bancos de células e empresas de biotecnologia. Apesar de possuírem uma menor capacidade de expansão *in vitro*, as células primárias preservam um maior número de características morfológicas e funcionais em comparação às linhagens contínuas, destacando-se principalmente a capacidade metabólica por enzimas do complexo citocromo P450, o que pode ser essencial na avaliação de pró-toxicantes (BOEI et al. 2017). Outra vantagem que torna seu uso interessante é a possibilidade de obtenção de espécimes celulares de determinados grupos de pacientes, como por exemplo portadores de doenças pulmonares, para avaliação dos efeitos de toxicantes sobre grupos populacionais específicos (HIEMSTRA et al. 2018).

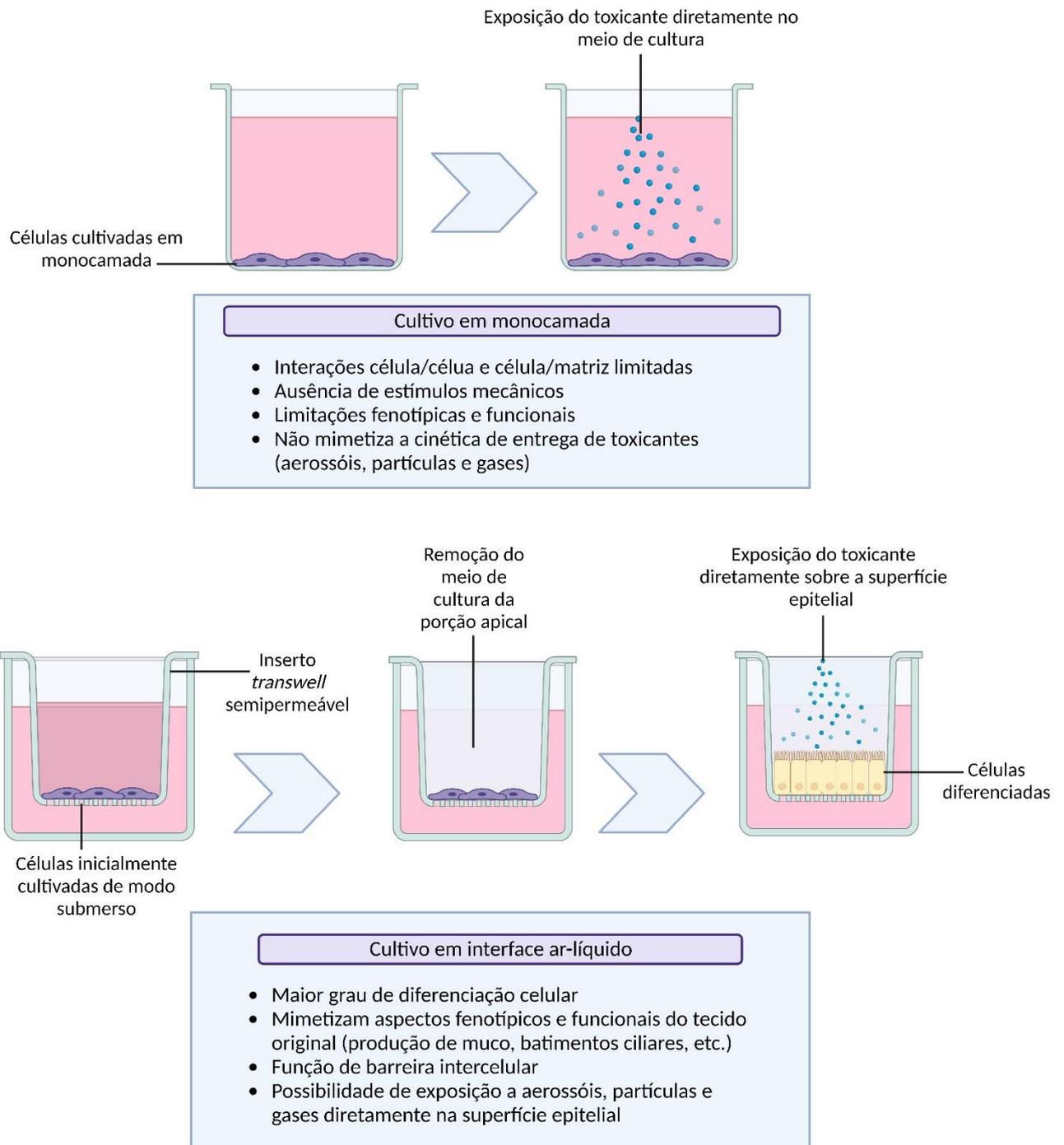
Os modelos de cultura celular baseados em monocamada apresentam limitações que podem, por conseguinte, comprometer sua capacidade preditiva em relação a alguns aspectos relacionados à toxicidade pulmonar, como a avaliação de um único tipo celular, contato intercelular limitado, ausência de interações do tipo célula-matriz extracelular, ausência de estímulos mecânicos e a impossibilidade de avaliação de parâmetros toxicocinéticos/sistêmicos (BÉRUBÉ, 2011). Além disso, a solubilização/dispersão de toxicantes no meio de cultura para posterior exposição das células de forma submersa não reflete a cinética de contato do sistema respiratório com substâncias inaladas, as quais adentram o organismo por meio do ar inalado sob a forma de partículas, gases ou aerossóis (HIEMSTRA et al. 2018).

Não obstante, apesar das limitações fenotípicas e funcionais oriundas dos processos de tumorigênese ou imortalização, ou da capacidade proliferativa limitada das células primárias, tais modelos podem ser utilizados de forma bem sucedida para avaliação pontual de efeitos de toxicantes pulmonares, desde que o estudo seja bem delineado e o parâmetro celular a ser medido seja expresso de maneira reprodutível pela linhagem celular de escolha.

### 1.3.2.2 – Modelos de cultura celular em interface ar-líquido (ALI)

Com o objetivo de suprir as limitações apresentadas pelos modelos celulares cultivados em monocamada, os sistemas de cultivo em interface ar-líquido (ALI) emergiram como opções que mimetizam de modo mais legítimo o constante contato do sistema respiratório com o ar inalado. Tais modelos são obtidos mediante o cultivo das células oriundas do trato respiratório em insertos *transwell* semipermeáveis, os quais permitem a nutrição destas pela porção basal, enquanto a porção apical permanece em contato com o ar. Essa configuração permite que as células epiteliais adquiram um maior grau de diferenciação, podendo ainda ser expostas aos toxicantes avaliados experimentalmente sob a forma de partículas, gases ou aerossóis que se depositam diretamente sobre a superfície do tecido reconstruído (Figura 7) (UPADHYAY; PALMBERG, 2018).

Figura 7: Representação esquemática das principais diferenças entre o cultivo celular em monocamada e interface ar-líquido



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

Por possuírem um maior grau de diferenciação celular, os modelos cultivados em ALI podem ser reconstruídos de forma a representarem diferentes porções do trato

respiratório, incluindo a cavidade nasal (SIBINOVSKA et al. 2019), laringe (LUNGOVA et al. 2019), segmento brônquico (RAYNER et al. 2019) e a parede alveolar (TOLLSTADIUS et al. 2019). Esses tecidos reconstruídos mimetizam também vários aspectos morfológicos e funcionais dos diferentes compartimentos do sistema pulmonar, para os quais é possível avaliar parâmetros fisiológicos que abrangem produção de muco (CAO et al. 2018), frequência de batimentos ciliares (PIQUÉ et al. 2018), expressão de enzimas metabólicas (BAXTER et al. 2015) e capacidade de regeneração tecidual (SCHAGEN et al. 2018). Ademais, é possível cultivar os modelos em ALI por períodos mais extensos em comparação às células cultivadas em monocamada, o que permite a realização de exposições repetidas para a mensurações dos efeitos de forma subaguda/subcrônica (COZENS et al. 2018; SCHAGEN et al. 2018).

Os tecidos reconstruídos em ALI agregaram aos modelos *in vitro* os primeiros atributos para avaliação de parâmetros farmacocinéticos/toxicocinéticos, uma das características mais desafiadoras considerando as abordagens não-animais para avaliação de efeitos sobre o trato respiratório, permitindo realizar a estimativa de absorção de compostos através da porção epitelial. Esses sistemas apresentam várias características cruciais para a estimativa da absorção transepitelial de substâncias, incluindo a formação de *tight junctions* com consequente função de barreira intercelular (SIBINOVSKA et al. 2019; FURUBAYASHI et al. 2020), expressão de transportadores ativos na membrana plasmática (NURBAETI et al. 2018), capacidade metabólica por meio de isoenzimas do citocromo P450 (FOSTER et al. 2000; BAXTER et al., 2015) e expressão de receptores FcRn (BEQUIGNON et al. 2019).

Os modelos de cultivo em ALI podem ser desenvolvidos no próprio laboratório mediante o cultivo de células primárias (NHBE) ou contínuas (Calu-3, BEAS-2B e A549) em insertos *transwell*, bem como adquiridos de empresas de biotecnologia que comercializam tecidos reconstruídos. Os tecidos comerciais mais utilizados incluem os modelos SmallAir<sup>®</sup> e MucilAir<sup>®</sup> da empresa Epithelix<sup>™</sup>, bem como o EpiAirway<sup>®</sup> e EpiAlveolar<sup>®</sup> da companhia MatTek<sup>™</sup> Life Sciences. Tanto os modelos comerciais quanto os desenvolvidos *in house* permitem a avaliação de vários parâmetros inerentes à avaliação da resposta a toxicantes inalados, incluindo a produção de citocinas inflamatórias, o *clearance* mucociliar, citotoxicidade e produção de defensinas como elementos da resposta imune inata (BEUBLER et al. 2016; DE SERVI et al. 2017; TRIANTAFILLOU et al. 2018).

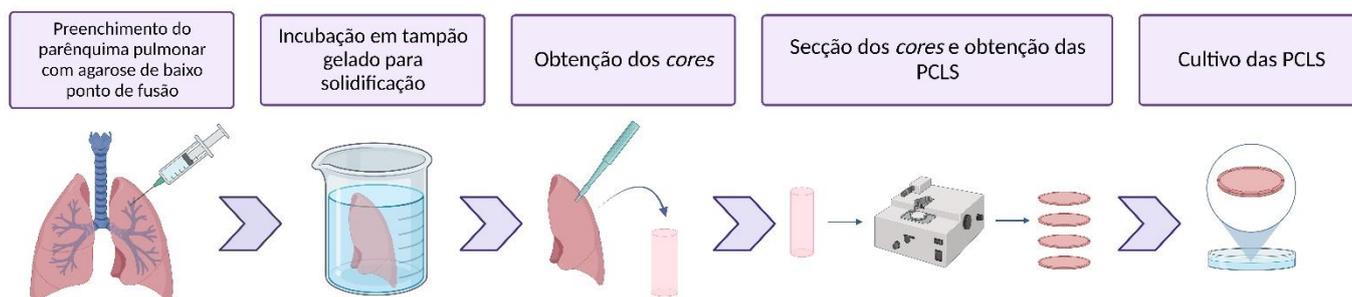
Outra limitação transposta pelos sistemas de cultivo em ALI foi a possibilidade de integrar células de diferentes origens em um mesmo componente, visando avaliar a

comunicação intercelular mediante diferentes estímulos, dada a pluralidade de tipos celulares que compõem o trato respiratório (BARKAUSKAS et al. 2017). Estão descritos na literatura modelos que integram células epiteliais, endoteliais, monocíticas e fibroblastos pulmonares, os quais podem ser aplicados para avaliação de toxicidade pulmonar de sensibilizantes respiratórios (MIZOGUCHI et al. 2017; CHARY et al. 2018) e materiais particulados (KLEIN et al. 2013; Fizeşan et al. 2019; TIAN et al. 2019).

### 1.3.2.3 – Human precision-cut Lung Slices (hPCLS)

As fatias pulmonares de alta precisão, no inglês *Precision-cut Lung Slices* (PCLS), consistem em fragmentos derivados de explantes do parênquima pulmonar que são precisamente seccionados a 100-500µm de espessura, os quais podem ser mantidos funcionais e viáveis em condições de cultivo celular por um período de curto a médio prazo (Figura 8). Os modelos PCLS possuem vários atributos que os tornam consideravelmente relevantes no âmbito pré-clínico, uma vez que os mesmos preservam toda a microarquitetura e topografia do tecido pulmonar, bem como as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, orquestrando toda a resposta que ocorre a nível tecidual nos pulmões após um dado estímulo, tanto em condições saudáveis quanto patológicas (LIU et al. 2019).

Figura 8: Representação esquemática do processo de obtenção das PCLS



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

Uma das principais vantagens do modelo de PCLS em relação às demais abordagens mencionadas é a multiplicidade de tipos celulares que esses tecidos trazem consigo, inclusive o arcabouço de células do sistema imune que proporcionam uma resposta inflamatória robusta em casos de exposição a imunógenos comumente utilizados em estudos pré-clínicos, como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS) e 12-O-

Tetradecanoylphorbol-13-acetate (PMA) (NEUHAUS et al. 2017; TEMANN et al. 2017). Ademais, esses modelos preservam ainda a estrutura das vias aéreas menores, bem como a rede vascular, permitindo a avaliação *in vitro* de parâmetros que incluem broncoconstrição, produção de muco, integridade ciliar, e vasoconstrição/vasodilatação (DANOV et al. 2018; RIEG et al. 2019).

Os modelos de PCLS têm sido extensivamente utilizados principalmente na compreensão de mecanismos fisiopatológicos de diferentes doenças, bem como na avaliação de parâmetros que se correlacionem com distintos desfechos clínicos, por exemplo a broncoconstrição mediada por IgE que acontece na asma alérgica (KOZIOL-WHITE et al. 2016), bem como a hiper-responsividade das vias aéreas induzida por fármacos, como o carbacol e a metacolina (STURTON et al. 2008; DANOV et al. 2018; KENNEDY et al. 2019).

Uma das principais limitações desses modelos é a baixa disponibilidade de tecido pulmonar humano para obtenção das secções, o que depende de uma melhor articulação entre pesquisadores e médicos para que esse material seja destinado ao setor acadêmico em condições nas quais possa ser utilizado (ALSAFADI et al. 2020). Apesar de vários autores descreverem a utilização de tecidos oriundos de animais, principalmente roedores, estudos mostram a existência de consideráveis diferenças interespecies, principalmente no que tange a expressão de enzimas metabólicas que podem estar relacionadas à ativação de pró-toxicantes e pró-haptenos (YILMAZ et al. 2018).

### 1.3.3 – Estratégias de bioengenharia aplicadas ao contexto da avaliação de toxicidade pulmonar

Com a mudança de paradigma imposta pela Toxicologia do Século XXI, houve um aumento na especificidade dos parâmetros a serem avaliados por meio das NAMs, de modo que modelos mais complexos e fisiologicamente relevantes foram requeridos para viabilizar a elucidação mecanística do modo de ação de toxicantes. Nesse contexto, a engenharia de tecidos proporcionou numerosos avanços na obtenção de modelos organotípicos integrando aos métodos *in vitro* vários aspectos importantes para mimetizar a forma e função de órgãos, incluindo polarização celular, interações célula-célula/célula-matriz extracelular, maior grau de diferenciação tecidual e obtenção de unidades morfofuncionais de órgãos e tecidos (LANGER; VACANTI, 2016).

A engenharia de tecidos é um ramo da ciência que se dedica à obtenção de tecidos biológicos artificialmente produzidos em laboratório mediante a combinação de fatores que

incluem células vivas e funcionais, materiais biocompatíveis também denominados de *scaffolds*, bem como de elementos bioquímicos (fatores de crescimento) e/ou mecânicos (*sheer stress* e movimentos contráteis cíclicos). Essa combinação permite recriar tecidos biomiméticos com maior grau de similaridade com órgãos humanos funcionais, sendo utilizada tanto para avaliação pré-clínica de produtos quanto em medicina regenerativa (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011).

### 1.3.3.1 – *Organoides pulmonares*

Os organoides pulmonares podem ser definidos como tecidos multicelulares auto-organizados que mimetizam diferentes partes do trato respiratório, estabelecendo interações entre os diferentes tipos celulares que são cruciais para a fisiologia e funcionalidade tecidual. Tais estruturas podem ser obtidas de diferentes fontes celulares, incluindo células primárias e células-tronco indiferenciadas, visando recriar diferentes segmentos do trato respiratório, incluindo as vias aéreas e a região alveolar (NADKARNI et al. 2016; BARKAUSKAS et al. 2017).

Tais organoides são os modelos mais bem empregados para o estudo do desenvolvimento e formação embrionária do sistema respiratório, uma vez que o crescimento organotípico pode ser detalhadamente monitorado durante todo o período de cultivo, partindo desde o fenótipo embrionário até a diferenciação terminal de estruturas ramificadas que refletem o padrão de ramificação bronquial/alveolar (DYE et al. 2016; CHEN et al. 2018; MAGRO-LOPEZ et al. 2018). Esses atributos combinados com as similaridades transcricionais entre os organoides derivados de células-tronco e o pulmão fetal humano subsidiam seu uso em estudos que compreendem a formação, maturação e o desenvolvimento de doenças pulmonares congênitas ou induzidas (DYE et al. 2015).

Considerando a elucidação de mecanismos de doenças quimicamente induzidas, os organoides pulmonares são uma ferramenta útil para a compreensão das vias de sinalização ativadas pela comunicação entre células mesenquimais e epiteliais. Até o momento, já foram descritas aplicações de tais modelos para a elucidação de diversos mecanismos fisiopatológicos, incluindo a produção de biomarcadores relacionados ao enfisema pulmonar (HU et al. 2020), a interação epitelial-mesenquimal durante o reparo do parênquima (TAN et al. 2019), a fibrose pulmonar (KOBAYASHI et al. 2020) e a carcinogênese química (NARUSE et al. 2020).

Apesar de a grande maioria dos organoides descritos na literatura e aplicados em tais provas de conceito terem sido produzidos com células de origem animal, atualmente

existem opções de tipos celulares fisiologicamente mais relevantes para seres humanos, como é o caso da tecnologia de células-tronco humanas pluripotente induzidas (hiPSCs). Os modelos produzidos empregando esse tipo de tecnologia já foram empregados para mimetizar diversos aspectos de condições patológicas do pulmão, compreendendo a displasia broncopulmonar (SUCRE et al. 2016), fibrose pulmonar idiopática (STRIKLOUDIS et al. 2019) e a deficiência de proteína surfactante B (LEIBEL et al. 2019).

As principais limitações para a aplicação dos organoides pulmonares em estudos de toxicidade são o alto custo para obtenção, bem como os longos períodos necessários para a total diferenciação das subpopulações celulares, requerendo extensivas etapas de caracterização e monitoramento de todo o processo. Contudo, os longos períodos de cultivo necessários podem também sinalizar a oportunidade de utilização em estudos de toxicidade subcrônica, por exemplo, onde maiores tempos de exposição ao toxicante são requeridos.

#### 1.3.3.2 – *Tecidos pulmonares reconstruídos mediante repovoamento de matrizes descelularizadas*

Uma vez que o comportamento celular *in vitro* é diretamente modulado pela interação das células com o microambiente no qual estão ancoradas, um dos principais desafios da bioengenharia é padronizar *scaffolds* que recriem a microarquitetura tecidual de determinado órgão ou tecido, de modo a recriar estruturas morfofuncionais que reflitam a nanotopografia e a fisiologia de um determinado sistema. Nesse contexto, as matrizes extracelulares descelularizadas (dECM) emergiram como uma alternativa valiosa que permite preservar elementos teciduais estruturais que são fundamentais para a ancoragem e proliferação/diferenciação de células adicionadas a tecidos reconstruídos (GILPIN; YANG, 2017).

O processo de descelularização tecidual consiste no uso de diferentes estratégias para realizar a remoção das células originalmente presentes no tecido utilizando técnicas enzimáticas, químicas ou mecânicas as quais preservam, contudo, o arcabouço da matriz extracelular, permitindo o crescimento de células que venham ser posteriormente adicionadas na matriz acelular (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015). Dentre os elementos teciduais preservados, destacam-se os diferentes tipos de colágeno (tipo I e tipo IV), glicosaminoglicanos (GAGs), glicoproteínas e outras proteínas tecido-específicas que regulam a sinalização celular (MCCRARY et al. 2020). A preservação do microcomposição tecidual permite, por sua vez, preservar diversas funções histofisiológicas, como por

exemplo a regulação da proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação, bem como respostas de remodelamento e cicatrização pós-agressão (CRAPO et al. 2011).

O processo de descelularização tem sido extensivamente estudado para aplicações no âmbito clínico da medicina regenerativa e para aplicações em transplantes de órgãos, uma vez que a remoção de componentes celulares de doadores reduz substancialmente as chances de rejeição pelo indivíduo receptor devido a incompatibilidades genéticas (O'NEIL et al. 2013). Contudo, no contexto da avaliação pré-clínica de produtos e toxicantes inalados, a literatura ainda é escassa do que tange o desenvolvimento de modelos reconstruídos empregando-se essa plataforma tecnológica. Em 2015, Melo e colaboradores desenvolveram um tecido brônquico reconstruído utilizando a parede da traquéia suína descelularizada, no qual realizaram a co-cultura de células epiteliais brônquicas, fibroblastos e células endoteliais. Os resultados do estudo demonstraram que o tecido apresentou função de barreira, expressão de biomarcadores fenotípicos e polarização celular compatível com o tecido brônquio humano sendo, portanto, aplicável para a condução de estudos pré-clínicos que contemplem a avaliação de parâmetros das vias aéreas superiores (MELO et al. 2015).

Até o momento, as principais aplicações das matrizes pulmonares descelularizadas em âmbito pré-clínico têm sido associadas à elucidação de mecanismos de doenças, para os quais já foram estudados o comportamento celular no carcinoma metastático (XIONG et al. 2016), na fibrose pulmonar idiopática (VAN DER VELDEN et al. 2018) e na doença pulmonar obstrutiva crônica (WAGNER et al. 2014). Uma vez que esses sistemas de cultivo permitem recriar diversos aspectos da interação entre as células e o microambiente tecidual, os mesmos podem ser considerados uma estratégia considerável na obtenção de modelos fisiologicamente relevantes para aplicação como NAMs visando a substituição de animais (MCCRARY et al. 2020).

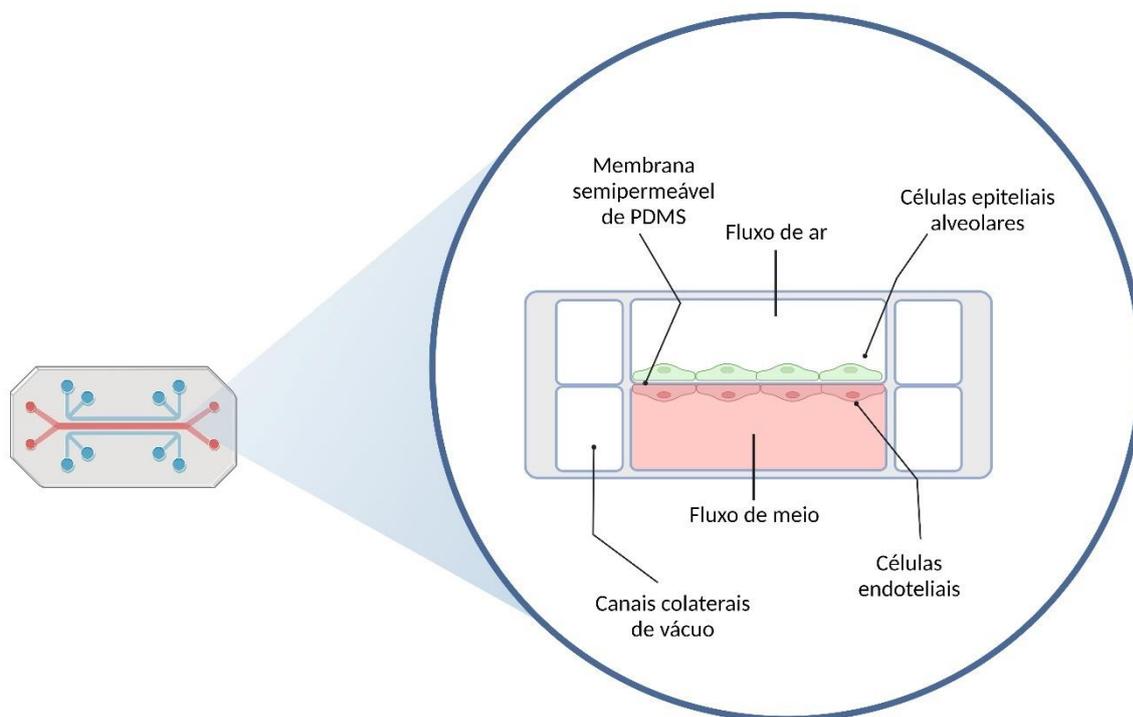
### 1.3.3.3 – Sistemas microfisiológicos

Por definição, os sistemas microfisiológicos (MPS) consistem em dispositivos microfluidicos capazes de simular a biologia humana *in vitro* na menor escala biologicamente aceitável (MARX et al. 2020). Os MPS surgiram com a necessidade de suprir as limitações dos demais modelos *in vitro*, as quais incluíam principalmente a falta de atributos dinâmicos e mecânicos, bem como o cultivo em condições estáticas que não permitiam simular a biodistribuição de substâncias entre diferentes órgãos e tecidos (LEE; SUNG, 2018).

A tecnologia de MPS, anteriormente chamada de *organs-on-a-chip*, adveio de avanços exponenciais nas técnicas de litografia e fotolitografia (WHITESIDES; STROOCK 2001; SIA; WHITESIDES, 2003), as quais permitiram a obtenção de dispositivos contendo canais microfabricados que simulam o fluxo sanguíneo, habilitando a interconexão de diferentes módulos que por sua vez podem conter distintos tecidos reconstruídos ou organoides, simulando uma resposta sistêmica (IMURA; SATO; YOSHIMURA, 2010; KIMURA; SAKAI; FUJII, 2018; LEE; SUNG, 2018; MITTAL et al. 2019).

No contexto da avaliação pulmonar pré-clínica, os modelos de *lung-on-a-chip* têm se mostrado úteis para avaliar parâmetros teciduais relacionados à fisiologia respiratória. Em 2010, Huh e colaboradores propuseram um modelo de barreira alveolo-capilar reconstruído sobre uma membrana de poli(dimetilsiloxano) (PDMS), o qual era povoado com células epiteliais alveolares e endoteliais paralelamente em diferentes compartimentos. O modelo era conectado por canais laterais providos de aplicação de vácuo intermitente, os quais permitiam o estiramento da membrana de PDMS de modo a simular o movimento de expansão e relaxamento da parede alveolar. Além disso, o canal endotelial era continuamente perfundido com meio de cultura, enquanto a porção epitelial permaneceu em contato com o ar (Figura 9). Esse modelo é o que melhor reflete simula *in vitro* os principais atributos do tecido alveolar considerando um cenário de relevância fisiológica, no qual foi possível avaliar a produção de citocinas, expressão de biomarcadores de ativação endotelial e a transmigração de leucócitos entre os diferentes compartimentos (HUH et al. 2010).

Figura 9: Representação esquemática do modelo de *lung-on-a-chip* proposto por Huh e colaboradores (2010).



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

Desde então, os MPS que modelam o sistema respiratório têm passado por diferentes otimizações, incluindo o padrão fluídico (LONG et al. 2012), a composição da membrana semipermeável (YANG et al. 2018), bem como a simplificação da produção dos dispositivos por meio de técnicas de impressão 3D (SHRESTHA et al. 2019). Além disso, existe ainda a possibilidade de construir esses sistemas com células primárias oriundas de pacientes, assim como mimetizar a mecânica respiratória diafragmática, aumentando o número de parâmetros fisiológicos abrangidos por tais modelos (STUCKI et al. 2015).

Outro importante aspecto atribuído aos MPS é a possibilidade de avaliação de aspectos farmacocinéticos e toxicocinéticos *in vitro*. Além de permitirem a investigação da deposição e permeação transepitelial de partículas e substâncias em bicamadas celulares, existe ainda a possibilidade de integrar organoides dos diferentes segmentos do trato respiratório, indo além da abordagem monocompartimental permitida por outros métodos,

habilitando a predição do metabolismo/ativação de toxicantes, bem como a mensuração de possíveis efeitos sistêmicos oriundos da exposição pulmonar a xenobióticos (MOGHADAS et al. 2018; FROST et al. 2019; FROST et al. 2020).

Apesar dos numerosos avanços que a tecnologia de MPS tem viabilizado no contexto de avaliação de toxicidade pré-clínica, suas principais limitações incluem a necessidade de aparatos específicos (chips e equipamentos de bombeamento), o alto custo e a dificuldade de se compreender a origem dos metabólitos e biomarcadores solúveis produzidos dentro dos sistemas, uma vez que todos os tecidos são perfundidos pelo mesmo líquido. Tais características têm limitado sua aplicação, principalmente no âmbito da toxicologia regulatória, onde um alto nível de harmonização paramétrica é requerido.

### 2.1 – Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi empregar estratégias de bioengenharia e Novas Abordagens Metodológicas (NAMs) para a determinação de parâmetros fisiologicamente relevantes para avaliação pré-clínica de sensibilizantes pulmonares de baixo peso molecular, visando a obtenção de modelos que possam ser empregados na avaliação *in vitro* de toxicantes inalados.

### 2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de interação entre sensibilizantes respiratórios químicos e o muco pulmonar, por meio do ensaio *in chemico* de avaliação espectroscópica de complexação com mucina;
- Avaliar a citotoxicidade de sensibilizantes respiratórios sobre linhagens de células do sistema pulmonar, contemplando células epiteliais brônquicas (BEAS-2B), fibroblastos (MRC-5), células endoteliais (EA.hy926) e células monocíticas (THP-1);
- Avaliar o perfil de citocinas produzido pelas linhagens celulares BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1 nas amostras de lisado e sobrenadante após exposição aos sensibilizantes respiratórios;
- Avaliar a expressão das proteínas MUC1 e Nrf2 pelas células epiteliais brônquicas BEAS-2B expostas aos sensibilizantes pulmonares;
- Avaliar a expressão dos marcadores de ativação/maturação de células dendríticas CD86, HLA-DR e CD11b no modelo de células dendríticas THP-1 após exposição aos sensibilizantes respiratórios;
- Avaliar a influência da expressão da molécula de adesão ICAM-1 pela linhagem de células endoteliais EA.hy926 exposta aos sensibilizantes pulmonares;
- Padronizar a obtenção e caracterizar um modelo brônquico 3D de co-cultura empregando as linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1;
- Realizar a exposição do modelo 3D de co-cultura a aerossóis do sensibilizante anidrido maleico utilizando o sistema de nebulização VitroCell® Cloud 12™, e avaliar a viabilidade tecidual por meio do método de redução do MTT;

- Avaliar o perfil de citocinas global e da linhagem THP-1 presente no compartimento basal do modelo 3D após exposição a aerossóis de anidrido maleico;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a atividade de caspase-3 e a expressão de MUC1 e NF-kB na porção epitelial do modelo 3D de cocultura após exposição aos aerossóis de anidrido maleico;
- Padronizar a obtenção de uma matriz brônquica descelularizada empregando-se diferentes métodos de remoção dos componentes celulares;
- Avaliar a estrutura tecidual e a composição da matriz extracelular dos fragmentos brônquicos descelularizados, no que tange a composição de fibras colágenas e glicosaminoglicanos;
- Proceder com o repovoamento da matriz extracelular brônquica com as células epiteliais Calu-3, bem como avaliar histologicamente o crescimento das mesmas sobre o *bioscaffold*;
- Caracterizar o epitélio brônquico formado pelas células Calu-3, avaliando a expressão dos biomarcadores pan-citoqueratina, E-caderina e MUC5AC.

### 3.1 – Delineamento experimental

O presente estudo foi conduzido mediante a execução de quatro etapas distintas, as quais incluíram a avaliação dos efeitos de sensibilizantes respiratórios de baixo peso molecular em células não imunológicas (etapa 1) e monocíticas (etapa 2); a obtenção de um modelo 3D de co-cultura e avaliação dos efeitos de aerossóis do sensibilizante anidrido maleico após exposição deste em interface ar-líquido (etapa 3); padronizar a obtenção de uma matriz brônquica suína descelularizada para utilização em bioengenharia de modelos pulmonares in vitro (etapa 4). O fluxograma das avaliações realizadas nas diferentes etapas está descrito na Figura 10.

Figura 10: Representação esquemática do desenho experimental das diferentes etapas realizada no presente estudo.



Criado na plataforma BioRender.com

### 3.1 – Cultivo celular

As linhagens celulares BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A linhagem de células epiteliais brônquicas BEAS-2B foi cultivada no meio quimicamente definido *Bronchial Epithelial Basal Medium* (BEBM) (Lonza, Basel, Suíça) suplementado com apotransferrina (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), insulina (20 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido retinóico (2 µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), triiodotironina (50 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), epinefrina (2 µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), extrato de pituitária bovina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), hidrocortisona (200 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), *epidermal growth factor* (10 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina (Gibco, Waltham, MA, EUA). As células BEAS-2B foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, Nova Iorque, EUA) previamente revestidos com solução de *coating* composta por fibronectina humana (0,01mg/mL) (Gibco, Waltham, MA, EUA), albumina de soro bovino (0,01 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e colágeno tipo I de cauda de rato (0,03 mg/mL) (Gibco, Waltham, MA, EUA), na densidade de 3.000 células/cm<sup>2</sup>. Ao atingirem cerca de 80% de confluência, as células eram lavadas com 10 mL de *Phosphate-buffered saline* (PBS) e submetidas a desagregação químico-enzimática com 2 mL de solução de tripsina/EDTA (0,25%/0,53 mM) contendo 0,5% de polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por aproximadamente 5 minutos. Após a dissociação, a solução enzimática era inativada mediante a adição de 6mL de meio completo e as células eram coletadas e centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos. Por fim, as células eram ressuspensas em 1mL de meio de cultura para posterior contagem e utilização nos experimentos descritos nas seções posteriores, bem como no subcultivo.

As células de fibroblasto de pulmão humano MRC-5 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose* (DMEM-HG), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Waltham, MA, EUA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina. A linhagem MRC-5 foi cultivada em frascos de 75 cm<sup>2</sup> na densidade de 1,5x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> e mediante 90% de confluência, era dissociada empregando-se 2mL de solução de tripsina/EDTA (0,25%/0,53 mM) por aproximadamente 3 minutos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sendo que a solução era inativada empregando-se 5mL de meio completo. Após a desagregação, as células eram coletadas,

centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos, sendo posteriormente ressuspensas em 1mL de meio de cultura para posterior contagem e subcultivo.

A linhagem de células endoteliais humanas EA.hy926 foi mantida em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de SFB e 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina, sendo cultivada em frascos de 75cm<sup>2</sup> e, mediante 90% de confluência, eram periodicamente dissociadas utilizando-se solução de tripsina/EDTA (0,25%/0,53 mM), por aproximadamente 3 minutos, a qual era inativada com 5mL de meio completo após total dissociação.

As células epiteliais brônquicas Calu-3 foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de Penicilina/Estreptomicina, 1% de aminoácidos não-essenciais e 0,05 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A linhagem foi mantida em frascos de 75cm<sup>2</sup> e dissociada periodicamente após atingirem 80% de confluência com solução de tripsina/EDTA (0,25%/0,53mM) por cerca de 5 minutos, a qual era inativada com 5 mL de meio completo.

A linhagem de células de leucemia monocítica aguda THP-1 foi cultivada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) suplementado com 10% de SFB, 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina e 0,05mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células cresceram em suspensão na densidade de 2x10<sup>5</sup> células/mL, de modo que a densidade celular era usualmente mantida abaixo de 1x10<sup>6</sup> células/mL.

Todas as linhagens celulares acima referidas foram mantidas em estufa de cultivo celular a 37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de ar e umidade controlada. A contagem das células BEAS-2B, EA.hy926 e THP-1 para subcultivo, bem como para utilização nos experimentos posteriormente descritos era conduzida mediante mistura de 10µL da suspensão celular com 10µL de solução de azul de tripan a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a qual era analisada em contador automático TC20™ (BioRad, Hercules, CA, EUA). Para a linhagem MRC-5, por outro lado, a contagem era realizada manualmente em câmara de Neubauer após proceder-se com a marcação por azul de tripan. Foram empregadas nos experimentos apenas células com viabilidade celular superior a 90%.

## **3.2 – Avaliação da citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios sobre as linhagens celulares em monocamada**

### 3.2.1 – Seleção e preparo dos sensibilizantes respiratórios

No presente estudo, foram avaliadas sete substâncias com potencial de sensibilização pulmonar conhecido e documentado na literatura mediante ensaios *in vivo*, bem como baseando-se em estudos observacionais de doenças pulmonares quimicamente induzidas em humanos mediante exposição, principalmente em ambiente ocupacional. As substâncias-teste utilizadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos sensibilizantes respiratórios de baixo peso molecular utilizados como substâncias-teste no presente estudo, bem como da concentração das soluções-estoque e do solvente utilizado no preparo dos mesmos.

<b>Abreviação</b>	<b>Substância</b>	<b>CAS</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Concentração da solução estoque</b>	<b>Solvente</b>
<b>CLT</b>	Cloramina-T	149358-73-6	Sigma-Aldrich	10mg/mL	Meio de cultura
<b>PIP</b>	Piperazina	110-85-0	Sigma-Aldrich	10mg/mL	Meio de cultura
<b>GLU</b>	Glutaraldeído	111-30-8	Amresco	10mg/mL	Meio de cultura
<b>ANM</b>	Anidrido Maleico	108-31-6	Sigma-Aldrich	2,5mg/mL	Meio de cultura
<b>CLC</b>	Cloreto Cianúrico	108-77-0	Sigma-Aldrich	1,0mg/mL	Meio de cultura
<b>CAT</b>	Cloreto de Anidrido Trimetílico	1204-28-0	Sigma-Aldrich	100mg/mL	DMSO
<b>ANT</b>	Anidrido Trimetílico	552-30-7	Sigma-Aldrich	100mg/mL	DMSO

Para tal, as substâncias-teste foram preparadas imediatamente antes da exposição, de modo que as substâncias hidrossolúveis foram solubilizadas no meio de cultura próprio para cada linhagem celular avaliada. Para as substâncias pouco solúveis em meio aquoso, por outro lado, foi preparada uma solução-estoque em DMSO, a qual foi posteriormente diluída em meio de cultura para exposição das células, de modo que a concentração de solvente permanecesse sempre inferior a 0,5%.

### 3.2.2 – Avaliação da citotoxicidade das substâncias-teste pelo método de redução do MTT

O efeito citotóxico dos sensibilizantes respiratórios sobre as linhagens utilizadas no estudo foi avaliado empregando-se o ensaio de redução do sal [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), proposto por Mosmann (1983). O princípio do método baseia-se na redução do sal de tetrazólio, o qual é inicialmente hidrossolúvel e possui coloração amarela, a formazan, um composto insolúvel que possui coloração púrpura. Tal processo de redução ocorre no compartimento matricial mitocondrial de células viáveis, sendo mediado pela enzima succinato desidrogenase, de modo que a formação do sal de formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis, o que pode ser quantificado por espectrofotometria UV/Vis (Figura 11).

Para tal, as linhagens celulares BEAS-2B, MRC-5 e EA.hy926 foram inicialmente distribuídas em placas de 96 poços conforme as densidades listadas na Tabela 2, sendo cultivadas por 24 horas para adesão. Em seguida, as linhagens foram expostas a oito concentrações de cada substância-teste, as quais foram preparadas no respectivo meio de cultura de cada linhagem, pelo período de 24 horas em estufa de cultivo celular, conforme ilustrado na Figura 12. A faixa de concentração de todas as substâncias avaliadas para cada linhagem celular está listada na Tabela 2. Após a exposição, o meio presente nas placas foi removido por inversão e as células foram incubadas com 100µL/poço de solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) preparado em meio de cultura na concentração de 0,5mg/mL pelo período de 3 horas em estufa de cultivo celular. Por fim, o conteúdo dos poços foi novamente removido por inversão, e os cristais de formazan foram solubilizados em 100µL/poço de Dimetilsulfóxido (DMSO), sob agitação de 300 RPM por 20 minutos, de modo que a absorbância do conteúdo dos poços foi determinada em espectrofotômetro leitor de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 560nm.

Para a linhagem THP-1, por se tratar de uma linhagem em suspensão, as células foram distribuídas em placas de 96 poços com fundo “U” (100µL/poço) e imediatamente

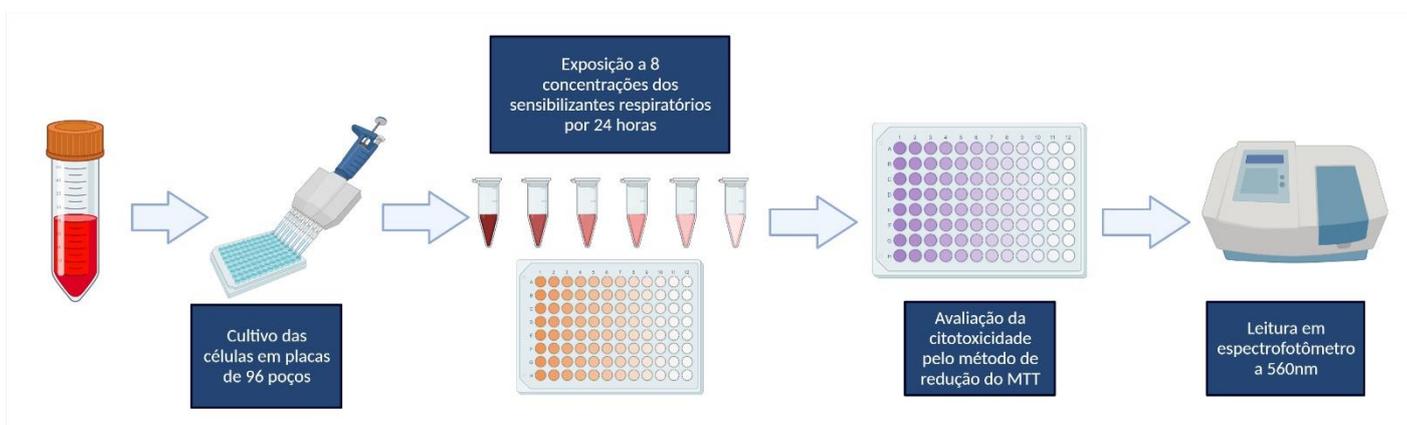
expostas às substâncias-teste nas faixas de concentração descritas na Tabela 2. Após 24 horas de exposição, foram adicionados a cada poço 10µL de solução de MTT a 5 mg/mL (concentração final de 0,5mg/mL) e as células foram incubadas em estufa de cultivo celular por 3 horas. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 800 RPM por 5 minutos, o sobrenadante presente nos poços foi aspirado e o pellet remanescente foi solubilizado em 100µL de DMSO/poço, sob agitação de 300 RPM por 20 minutos, e a absorbância do conteúdo dos poços foi determinada conforme descrito anteriormente.

O cálculo da viabilidade celular correspondente a cada concentração das substâncias avaliadas foi realizado conforme descrito na Equação 1, onde foram obtidos valores relativos à absorbância do controle negativo.

Equação 1: Cálculo da viabilidade celular das linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1 mediante exposição aos diferentes sensibilizantes respiratórios avaliados.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{Média da absorbância correspondente a cada concentração} - \text{Branco correspondente a cada concentração})}{(\text{Média da absorbância do controle negativo} - \text{Branco correspondente ao controle negativo})} \times 100$$

Figura 11: Fluxograma do ensaio de citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios de baixo peso molecular, realizado com as linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1 pelo método de redução do MTT.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

Figura 12: Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade realizado para avaliação dos sensibilizantes respiratórios empregando-se as linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1, por meio do método de redução do MTT. As células foram distribuídas nos poços centrais da placa de 96 poços, de modo que as linhas e colunas periféricas foram utilizadas como branco para a leitura espectrofotométrica. As colunas 2 e 11 foram utilizadas como controle negativo e controle de solvente, quando aplicável, e as células das colunas 3 – 10 foram expostas a concentrações decrescentes da substância-teste. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo expressos como a média de três experimentos independentes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	BCO CC	BCO C1	BCO C2	BCO C3	BCO C4	BCO C5	BCO C6	BCO C7	BCO C8	BCO CV	M
B	M	CC *	C1 *	C2 *	C3 *	C4 *	C5 *	C6 *	C7 *	C8 *	CV *	M
C	M	CC *	C1 *	C2 *	C3 *	C4 *	C5 *	C6 *	C7 *	C8 *	CV *	M
D	M	CC *	C1 *	C2 *	C3 *	C4 *	C5 *	C6 *	C7 *	C8 *	CV *	M
E	M	CC *	C1 *	C2 *	C3 *	C4 *	C5 *	C6 *	C7 *	C8 *	CV *	M
F	M	CC *	C1 *	C2 *	C3 *	C4 *	C5 *	C6 *	C7 *	C8 *	CV *	M
G	M	CC *	C1 *	C2 *	C3 *	C4 *	C5 *	C6 *	C7 *	C8 *	CV *	M
H	M	BCO CC	BCO C1	BCO C2	BCO C3	BCO C4	BCO C5	BCO C6	BCO C7	BCO C8	BCO CV	M

M – Meio de cultura; BCO – Branco; CC – Controle de células; C – Concentração da substância-teste; CV – Controle de veículo; \*Poços contendo células.

Tabela 2: Densidade celular e faixa de concentração de cada substância-teste empregadas nos ensaios de citotoxicidade pelo método de redução do MTT.

Linhagem celular	Densidade (N° de células/poço)	Faixa de concentração avaliada para cada substância-teste						
		CLT (mg/mL)	PIP (mg/mL)	GLU (µg/mL)	ANM (mg/mL)	CLC (mg/mL)	CAT (mg/mL)	ANT (mg/mL)
<b>BEAS-2B</b>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 – 0,0078	10,0 – 0,078	10,0 – 0,078	2,0 – 0,015	1,0 – 0,0078	1,0 – 0,0078	1,0 – 0,078
<b>MRC-5</b>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 – 0,0078	10,0 – 0,078	125,0 – 0,975	2,5 – 0,063	1,0 – 0,0078	1,0 – 0,0078	1,0-0,078
<b>EA.hy926</b>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 – 0,0078	10,0 – 0,078	250,0 – 1,95	2,5 – 0,063	1,0 – 0,0078	2,0 – 0,0156	1,0-0,078
<b>THP-1</b>	2,0 x 10 <sup>4</sup>	2,0 – 0,016	10,0 – 0,078	250,0 – 1,95	1,5 – 0,016	1,0 – 0,0078	2,0 – 0,0156	1,0 – 0,078

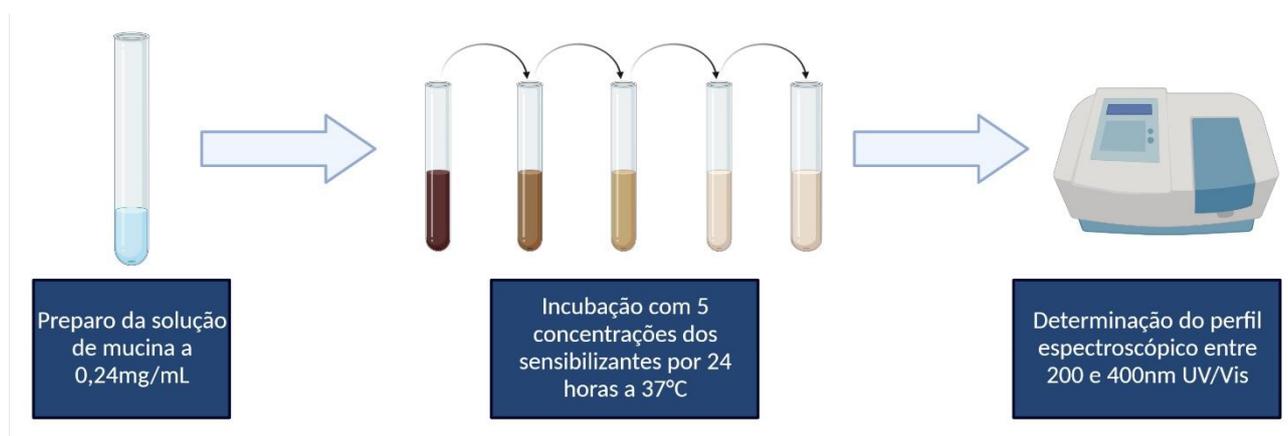
Abreviações: CLT: Cloramina-T; PIP: Piperazina; GLU: Glutaraldeído; ANM: Anidrido Maleico; CLC: Cloreto Cianúrico; CAT: Cloreto de Anidrido Trimetílico; ANT: Anidrido Trimetílico.

### **3.3 – Avaliação do potencial de complexação das substâncias-teste com mucina por meio de avaliação espectroscópica**

Visando investigar a capacidade de interação dos sensibilizantes químicos com o muco pulmonar, o ensaio de avaliação espectroscópica da proteína mucina foi conduzido. O princípio da técnica utilizada se baseia na capacidade de absorção de luz na região UV/Visível por resíduos de aminoácidos cromógenos presentes na cadeia da proteína-alvo. Especificamente considerando a mucina, principal componente proteico do muco pulmonar, essa proteína possui um pico de absorção na região de 260nm, e mudanças nesse perfil de absorção podem sinalizar uma potencial complexação com outras moléculas (PONTREMOLI et al. 2015).

Inicialmente, foi preparada uma solução de mucina isolada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em PBS na concentração de 0,24mg/mL, mediante agitação à temperatura ambiente por 4 horas. Posteriormente, as substâncias-teste foram preparadas conforme previamente descrito no item 3.2.1, de modo que as substâncias hidrossolúveis foram diretamente preparadas em PBS e as demais solubilizadas inicialmente em DMSO. Cada substância foi avaliada em cinco diferentes concentrações, as quais foram previamente determinadas com base no perfil de absorbância de cada composto isoladamente, de modo a evitar a sobreposição entre os espectros do toxicante e da proteína-alvo. As soluções-uso de cada composto foram preparadas em PBS, em uma concentração duas vezes superior à desejada, de modo que foram transferidos 2mL de cada uma para tubos de vidro contendo a solução de mucina anteriormente descrita (concentração final de mucina = 0,12mg/mL). Os tubos foram selados e incubados em estufa a 37°C por 24 horas e, posteriormente, o conteúdo destes foi transferido para cubetas de quartzo para a determinação do perfil espectroscópico da mucina em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), sendo executada uma varredura de 200 a 400nm (10nm de intervalo) (Figura 13). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo conduzidos três experimentos independentes.

Figura 13: Representação esquemática do ensaio *in chemico* de complexação dos sensibilizantes respiratórios com a proteína mucina.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

### 3.4 – Avaliação do perfil inflamatório das linhagens celulares após exposição aos sensibilizantes respiratórios

Com o objetivo de investigar a produção de mediadores inflamatórios desencadeada pela exposição das células do sistema pulmonar a sensibilizantes respiratórios, foram quantificadas tanto em amostras de lisado celular quanto de sobrenadante as citocinas pró-inflamatórias IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70, bem como da citocina anti-inflamatória IL-10 após exposição das linhagens a tais toxicantes. Tal quantificação foi feita por meio da técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA), cujo princípio se baseia na imobilização das citocinas solúveis em *beads* revestidas com anticorpos monoclonais específicos para posterior quantificação por citometria de fluxo. As vantagens da técnica incluem a possibilidade de quantificação simultânea de diferentes biomarcadores utilizando-se um volume relativamente pequeno de amostra, o que permite avaliar a ativação de diferentes vias celulares em uma dada condição experimental (Morgan et al., 2004).

Inicialmente, as células BEAS-2B ( $1 \times 10^5$  células/poço), MRC-5 ( $5,0 \times 10^4$  células/poço) e EA.hy926 ( $5,0 \times 10^4$  células/poço) foram cultivadas por 24 horas em placas de 24 poços e, em seguida, expostas aos sensibilizantes respiratórios avaliados pelo período de 24 horas. A concentração utilizada para exposição foi correspondente à  $CV_{80}$  de cada substância-teste, que corresponde à concentração na qual a viabilidade celular é de 80%, obtida previamente na etapa de avaliação da citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios. Após o período de exposição, o sobrenadante das culturas foi coletado e

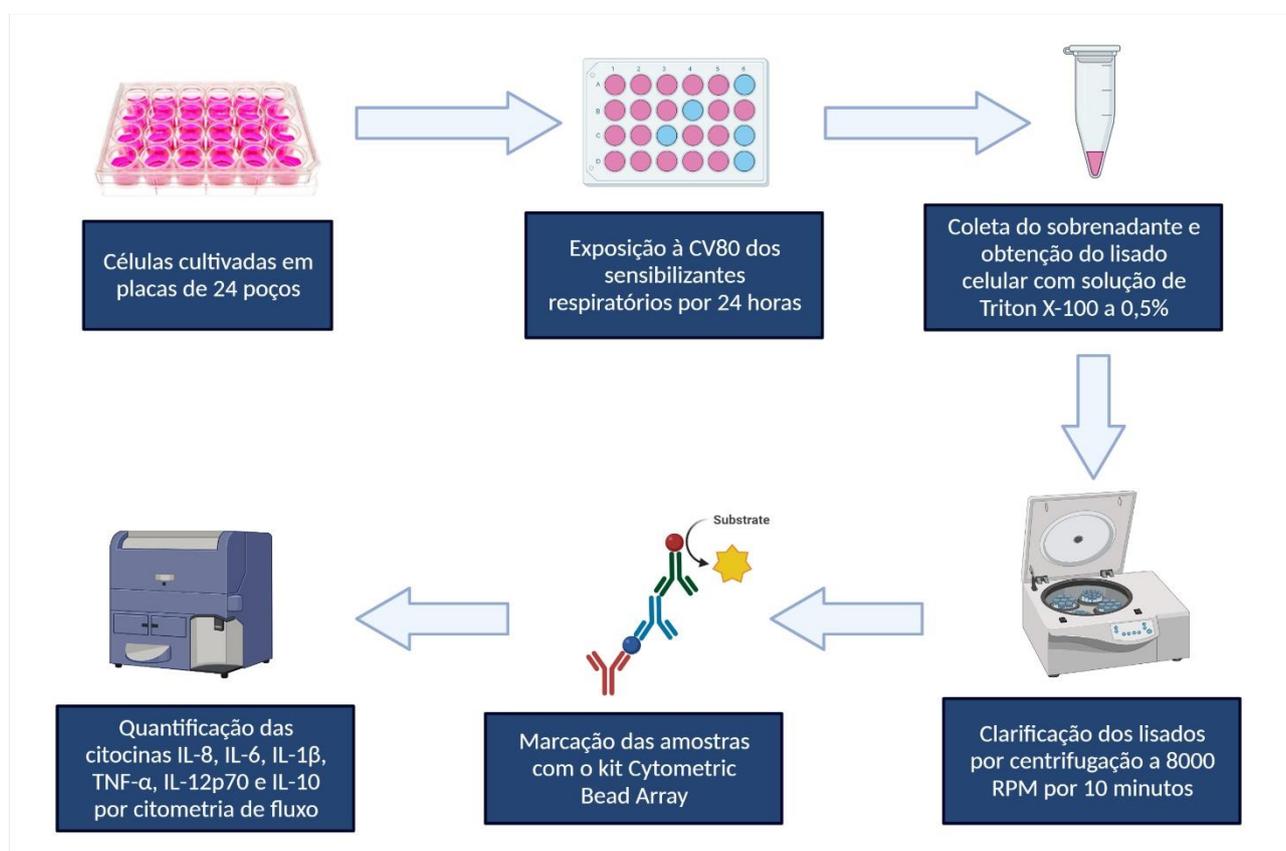
imediatamente armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , de forma que as células foram lavadas por duas vezes com 2mL de PBS/poço. Posteriormente, procedeu-se com a obtenção dos lisados celulares mediante adição de 200 $\mu\text{L}$ /poço do tampão de lise, composto por PBS acrescido de 0,5% de Triton X-100 (AMRESCO, Solon, OH, EUA) e coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de modo que a extração foi feita sob agitação de 200 RPM por 5 minutos. Por fim, o processo de lise foi finalizado mecanicamente mediante a lavagem dos poços com pipetador automático e os lisados foram coletados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da quantificação.

Para a linhagem THP-1, por outro lado, as células foram distribuídas em placas de 24 poços na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/poço e imediatamente expostas à  $\text{CV}_{80}$  de cada sensibilizante respiratório por 24 horas. Após esse período, o conteúdo dos poços foi transferido para microtubos de 1,5mL, os quais foram centrifugados a 1500 RPM por 5 minutos, de modo que o sobrenadante foi coletado e o pellet foi lavado com 1mL/tubo de PBS, centrifugando-se os tubos novamente nas mesmas condições supracitadas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuscitado em 200 $\mu\text{L}$  de solução de lise, sendo os tubos incubados em banho de gelo sob agitação de 300 RPM por 5 minutos. Por fim, os tubos foram rapidamente agitados em vórtex e as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as análises. No momento da quantificação, os lisados celulares foram centrifugados a 8000 RPM por 10 minutos para clarificação previamente ao início da etapa analítica.

A quantificação das citocinas foi realizada utilizando-se o kit *BD Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines* (Cat. 551811) (BD Biosciences, NJ, EUA), conforme instruções do fabricante. Inicialmente, o volume necessário de *beads* correspondentes aos biomarcadores IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 e TNF- $\alpha$  foi calculado e transferido para um tubo cônico, o qual foi centrifugado a 1200 RPM por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as *beads* foram ressuscitadas e incubadas com o reagente *Serum Enhancement Buffer* por 30 minutos, sendo posteriormente transferidas para placas de fundo "V" (12,5 $\mu\text{L}$ /poço). Posteriormente, foram adicionados a cada poço 12,5 $\mu\text{L}$  da amostra ou padrão, e 12,5 $\mu\text{L}$  do reagente de detecção, incubando-se a placa por 3 horas sob agitação de 300 RPM ao abrigo da luz. Após a incubação, as placas foram lavadas por duas vezes com o tampão de lavagem fornecido no kit (150 $\mu\text{L}$ /poço), sendo centrifugadas a 800 RPM por 5 minutos em cada lavagem. Por fim, as *beads* foram ressuscitadas em 200 $\mu\text{L}$ /poço do tampão de lavagem e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II

(BD, Biosciences, NJ, EUA), mediante a aquisição de 2000 eventos em *gate* (Figura 14). A quantificação das citocinas foi realizada por meio da interpolação linear da fluorescência quantificada nas amostras na curva-padrão de cada biomarcador, construída com o padrão de citocinas fornecido pelo kit, as quais abrangeram o intervalo de concentração de 0 – 5000 pg/mL. As análises quantitativas foram conduzidas utilizando-se o software BD FCAP Array Software v3.0 (BD, Biosciences, NJ, EUA). Ademais, para as amostras de lisado celular os resultados foram expressos como pg de citocina/mg de proteínas totais, de forma que o teor de proteínas totais presentes nos lisados foi determinado utilizando-se o kit *BCA Protein Quantitation* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), conforme instruções do fabricante. Por fim, os resultados da concentração de citocinas nas amostras foram expressos em relação ao controle negativo, sendo avaliados 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Figura 14: Representação esquemática da etapa de avaliação do perfil inflamatório nas amostras de sobrenadante e lisado celular das linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1, por meio do método de *Cytometric Bead Array* (CBA).



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

### 3.5 – Avaliação da expressão de ICAM-1 pela linhagem endotelial EA.hy926

Prosseguindo-se com a investigação das alterações induzidas por sensibilizantes respiratórios nos diferentes compartimentos celulares do sistema pulmonar, foi avaliada também a expressão do biomarcador de superfície *Intracellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) pela linhagem endotelial EA.hy926 por citometria de fluxo e imunofluorescência indireta após a exposição a tais toxicantes, a qual é uma molécula chave que desempenha funções cruciais em diferentes processos inflamatórios e hemostáticos que envolvem a participação do estrato endotelial (Singh et al., 2021).

#### 3.5.1 – Citometria de fluxo

Inicialmente, as células EA.hy926 foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de  $5,0 \times 10^4$  células/poço por 24 horas para adesão, sendo em seguida expostas à  $CV_{80}$  dos sensibilizantes respiratórios pelos períodos de 24 e 48 horas. Após a exposição, as células foram lavadas com 2mL de PBS/poço e coletadas mediante utilização de 200 $\mu$ L/poço do reagente de dissociação TrypLE Express (Gibco, Waltham, MA, EUA), sendo transferidas para tubos FACS. Depois de coletadas, as células foram lavadas por duas vezes com 2,0mL do tampão de marcação (PBS acrescido de 5% de soro fetal bovino), sendo centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, o sobrenadante oriundo das lavagens foi descartado, o *pellet* foi ressuspensionado em 200 $\mu$ L de tampão de marcação e as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) na diluição 1:100 por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram novamente lavadas por duas vezes com o tampão de marcação e incubadas com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse* AlexaFluor 555 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) na concentração de 1:500, por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as células foram novamente lavadas por duas vezes com tampão de marcação e uma vez com PBS gelado, ressuspensionadas em 200 $\mu$ L de PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD, Biosciences, NJ, EUA) mediante a aquisição de 10.000 eventos em *gate*. Para a interpretação dos resultados, os valores de intensidade média de fluorescência das células expostas aos sensibilizantes foram comparados aos do controle negativo para a obtenção da expressão relativa de ICAM-1, de forma a serem avaliados três experimentos independentes realizados em duplicata.

### 3.5.2 – Imunofluorescência indireta

Inicialmente, procedeu-se com o cultivo das células EA.hy926 sobre lamínulas circulares de vidro, o qual foi realizado em placas de 6 poços na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/poço. Após o cultivo por 24 horas, as células foram expostas à CV<sub>80</sub> de cada sensibilizante respiratório por 48 horas, sendo posteriormente lavadas com 2mL/poço de PBS e fixadas com 1mL/poço com solução de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos. Após a fixação, as células foram novamente lavadas com PBS e adicionou-se 1mL/poço de solução de bloqueio composta por 1% de soro-albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), incubando-se por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com 100µL/lamínula do anticorpo primário anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) na diluição de 1:50 pelo período de 1 hora em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas por 3 vezes com 2mL/poço de PBS. Depois de lavadas, as células foram incubadas com 100µL/lamínula de solução contendo o anticorpo secundário *Goat anti-mouse* AlexaFluor 555 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) na concentração de 1:500, por 1 hora ao abrigo da luz. Por fim, as células tiveram o núcleo marcado com solução de corante Hoescht 33342 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) a 10µg/mL por 5 minutos, foram lavadas por três vezes com PBS e analisadas em microscópio de fluorescência (DMI 4000B Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EUA).

### 3.6 – Avaliação da expressão dos biomarcadores MUC1 e Nrf-2 pela linhagem epitelial brônquica BEAS-2B

Considerando a linhagem epitelial BEAS-2B, além do perfil inflamatório foram avaliadas também a expressão das proteínas Nrf-2 e MUC1 após a exposição aos sensibilizantes respiratórios, visando explorar a participação das células epiteliais no processo de alergenicidade pulmonar. O fator de transcrição Nrf-2 consiste em um regulador de diversas vias de sinalização relacionadas ao stress oxidativo, o qual é acionado mediante a necessidade de ativação de elementos de defesa antioxidante em resposta a um dano oxidativo agudo. Sua ativação leva à transcrição de diversos genes relacionados à citoproteção e restauração do equilíbrio redox intracelular, de modo que seu papel tem sido extensivamente investigado na prevenção e patogenia de doenças pulmonares (Mizumura et al. 2020). A proteína MUC1, por outro lado, pertence à família das mucinas e trata-se de uma proteína ancorada à membrana plasmática de diversos tipos

celulares, incluindo células epiteliais brônquicas. Tratando-se de uma proteína transmembrana, o domínio extracelular da proteína MUC1 funciona como uma barreira para possíveis patógenos que acometam a mucosa do trato respiratório, enquanto a porção citoplasmática possui uma subunidade capaz de efetuar transdução de sinais que culminam na expressão de genes relacionados à atividade anti-inflamatória (Kato et al. 2017; Ballester, Milara, Cortigo 2021).

Para a avaliação da expressão dos biomarcadores Nrf-2 e MUC1, as células BEAS-2B foram cultivadas em placas de 12 poços previamente tratadas com solução de coating, na densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/poço por 24 horas para adesão, e em seguida expostas à CV<sub>80</sub> dos sensibilizantes respiratórios por 24 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com 2mL/poço de PBS e coletadas utilizando-se 1,0mL de solução de tripsina/EDTA (0,25%/0,53mM) contendo 0,5% de polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a qual foi neutralizada utilizando-se 2,0mL de meio completo. As células foram transferidas para tubos de citometria e lavadas com 2,0mL de PBS, sendo centrifugadas a 1500RPM por 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, o sobrenadante presente nos tubos foi descartado e as células foram fixadas com 200µL/ tubo de solução de paraformaldeído a 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, sendo novamente lavadas com 2,0mL de PBS/tubo após o processo. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com 200µL de solução de permeação (Triton X-100 a 0,5% preparado em PBS) por 15 minutos, sendo em seguida lavadas com 2mL/tubo do tampão de marcação (PBS acrescido de 0,1% de Soro-albumina Bovina e 0,1% de Triton X-100). Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 100µL do tampão de marcação e incubadas por 1 hora com o anticorpo conjugado correspondente às proteínas Nrf-2 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) e MUC1 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), nas diluições 1:1000 e 1:100, respectivamente. Após a incubação, as células foram lavadas por duas vezes com o tampão de marcação e 1 vez com PBS gelado, ressuspensas em 200µL de PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD, Biosciences, NJ, EUA), sendo adquiridos 10.000 eventos em *gate*. Os resultados foram expressos de acordo com a intensidade média de fluorescência correspondente a cada marcador avaliado, de modo que os valores dos grupos expostos aos sensibilizantes foram comparados aos do controle negativo para o cálculo da expressão relativa. Nessa etapa, foram avaliados três experimentos independentes realizados em duplicata.

### 3.7 – Avaliação da expressão dos marcadores de superfície CD86, HLA-DR e CD11c pela linhagem monocítica THP-1

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos sensibilizantes respiratórios em induzir alterações compatíveis com a ativação/maturação de células dendríticas, a linhagem de leucemia monocítica THP-1 foi utilizada como modelo para investigação desse parâmetro. As células THP-1, apesar de terem sido estabelecidas a partir de células leucêmicas, advêm da linhagem monocítica e se mantêm com diversos aspectos transcricionais, fenotípicos e funcionais relacionados à função de células dendríticas e macrófagos, o que as torna um modelo valioso para avaliação de diversos aspectos do sistema imune de forma reprodutível e desprovida de variações interindividuais (Deng et al. 2021). Ademais, essa linhagem atualmente é utilizada como sistema teste em ensaios *in vitro* de sensibilização dérmica, apresentando uma boa capacidade de responder mediante a exposição a substâncias alergênicas aumentando a expressão dos marcadores de superfície CD86 e CD54, os quais mimetizam a resposta de maturação e ativação de células dendríticas sem a necessidade de diferenciação prévia (OECD, 2022d).

#### 3.7.1 – Avaliação da citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios frente às células THP-1 por citometria de fluxo

Previamente à análise da expressão dos biomarcadores de superfície, a citotoxicidade dos sensibilizantes respiratórios foi analisada pelo método de marcação com iodeto de propídeo, conforme descrito no guia de teste no. 442E da OECD (OECD, 2022d). Para tal, as células THP-1 foram transferidas para placas de 24 poços na densidade de  $1,0 \times 10^6$  células/poço e expostas a quatro concentrações das substâncias-teste, as quais foram baseadas no ensaio de MTT previamente realizado, pelo período de 24 horas. Em seguida, as células foram transferidas para tubos FACS e lavadas por duas vezes com 2,0mL/tubo de PBS, sendo centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos em cada lavagem. Após as lavagens, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 100µL de PBS. As células foram analisadas por citometria de fluxo imediatamente após a marcação com 100µL/tubo de solução de Iodeto de Propídeo a 1,25µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), mediante a aquisição de 10.000 eventos em *gate*. Os valores de CV<sub>80</sub> foram calculados por meio de interpolação log-linear, de acordo com o guia no. 442E da OECD (2018), conforme descrito na equação a seguir:

$$\text{Log CV}_{80} = \frac{(80 - c) \times \log(b) - (80 - a) \times \log(d)}{a - c}$$

Onde:

a = valor mínimo de viabilidade celular acima de 80%;

c = valor máximo de viabilidade celular abaixo de 80%;

b e d = concentrações correspondentes aos valores de viabilidade celular representados por “a” e “c”, respectivamente.

### 3.7.2 – Avaliação da expressão dos biomarcadores CD86, HLA-DR e CD11c

Nessa etapa, as células THP-1 foram cultivadas em frascos de 75cm<sup>2</sup> na densidade de 2x10<sup>5</sup> células/mL por 48 horas previamente à realização do ensaio e, em seguida, foram distribuídas em placas de 24 poços (1,0x10<sup>6</sup> células/poço). Em seguida, as células foram expostas à CV<sub>80</sub> de cada sensibilizante respiratório avaliado, obtidos na etapa anterior de avaliação da citotoxicidade, pelo período de 24 horas. Após a exposição, as células foram transferidas para microtubos de 1,5mL e lavadas por 2 vezes com tampão de marcação (PBS acrescido de 2,5% de SFB), sendo centrifugadas a 1500RPM por 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, o sobrenadante foi removido por aspiração e as células foram ressuspensas em 1mL/tubo do tampão de marcação, sendo posteriormente transferidos 200µL da suspensão celular para diferentes tubos FACS previamente identificados. As células foram então marcadas com o anticorpo correspondente a cada proteína avaliada, sendo incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz com 2µL do anticorpo anti-CD86 conjugado à FITC (BD, Biosciences, NJ, EUA), 2µL do anticorpo anti-HLA-DR conjugado à APC-Cy7 (BD, Biosciences, NJ, EUA) ou 1µL do anticorpo anti-CD11c conjugado à APC-Cy5.5 (BD, Biosciences, NJ, EUA). Após a incubação, as células foram lavadas por duas vezes com 1mL/tubo do tampão de marcação e uma vez com PBS gelado, sendo posteriormente ressuspensas em 200µL de PBS e analisadas por citometria de fluxo mediante aquisição de 10.000 eventos em *gate*. Foram avaliados três experimentos independentes realizados em duplicata, de forma que o índice de estimulação foi calculado para cada biomarcador em relação ao controle negativo, conforme descrito na equação abaixo:

$$\text{Índice de estimulação (\%)} = \frac{\frac{\text{IMF das células expostas marcadas} - \text{IMF das células expostas não marcadas}}{\text{IMF das células do controle negativo marcadas} - \text{IMF das células do controle negativo não marcadas}}}{\text{IMF das células do controle negativo marcadas} - \text{IMF das células do controle negativo não marcadas}} \times 100$$

Onde:

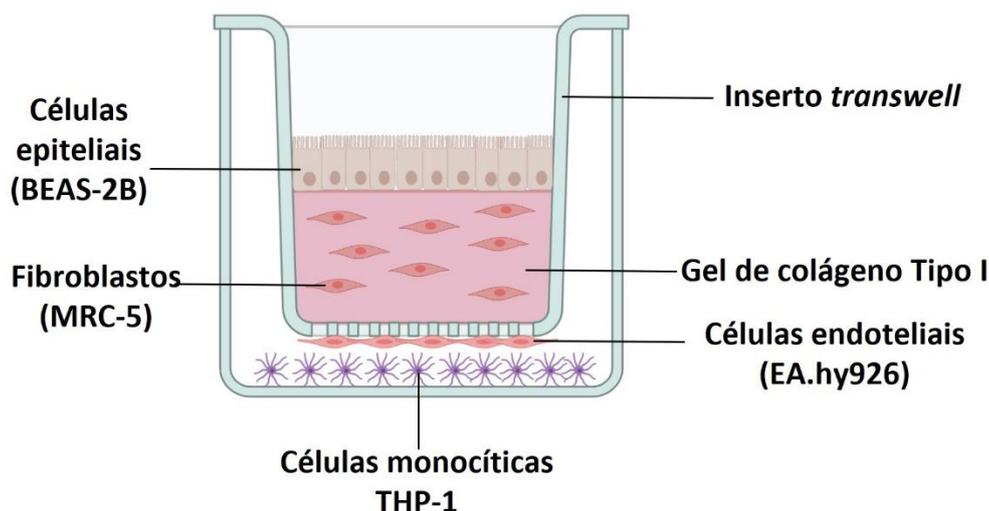
IMF = Intensidade média de fluorescência.

Os resultados foram considerados positivos para a alteração dos biomarcadores quando os valores de índice de estimulação foram iguais ou superiores a 150% por pelo menos dois experimentos consecutivos, tendo como base o fluxograma de decisão descrito no guia de teste no. 442E da OECD (OECD, 2022d).

### **3.8 - Obtenção e caracterização do modelo epitelial brônquico 3D de co-cultura das linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1**

Para se realizar a avaliação conjunta de parâmetros teciduais induzidos pelos sensibilizantes respiratórios, levando em consideração a comunicação intercelular em nível mais elevado de complexidade estrutural, no presente trabalho foi proposta a construção de um modelo 3D de co-cultura composto pelas quatro linhagens celulares anteriormente empregadas nos estudos conduzidos em monocamada. Diante disso, foi estabelecido um modelo brônquico cultivado em interface ar-líquido utilizando-se insertos *transwell* contendo três camadas distintas, compreendendo as células epiteliais brônquicas BEAS-2B ancoradas em uma matriz de colágeno Tipo I contendo fibroblastos MRC-5, de forma que a porção basal era composta por uma camada contínua de células endoteliais EA.hy926. As células THP-1, por sua vez, foram cultivadas diretamente no poço da placa, conforme ilustrado na Figura 15.

Figura 15: Representação esquemática do modelo 3D de co-cultura reconstruído mediante utilização das linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

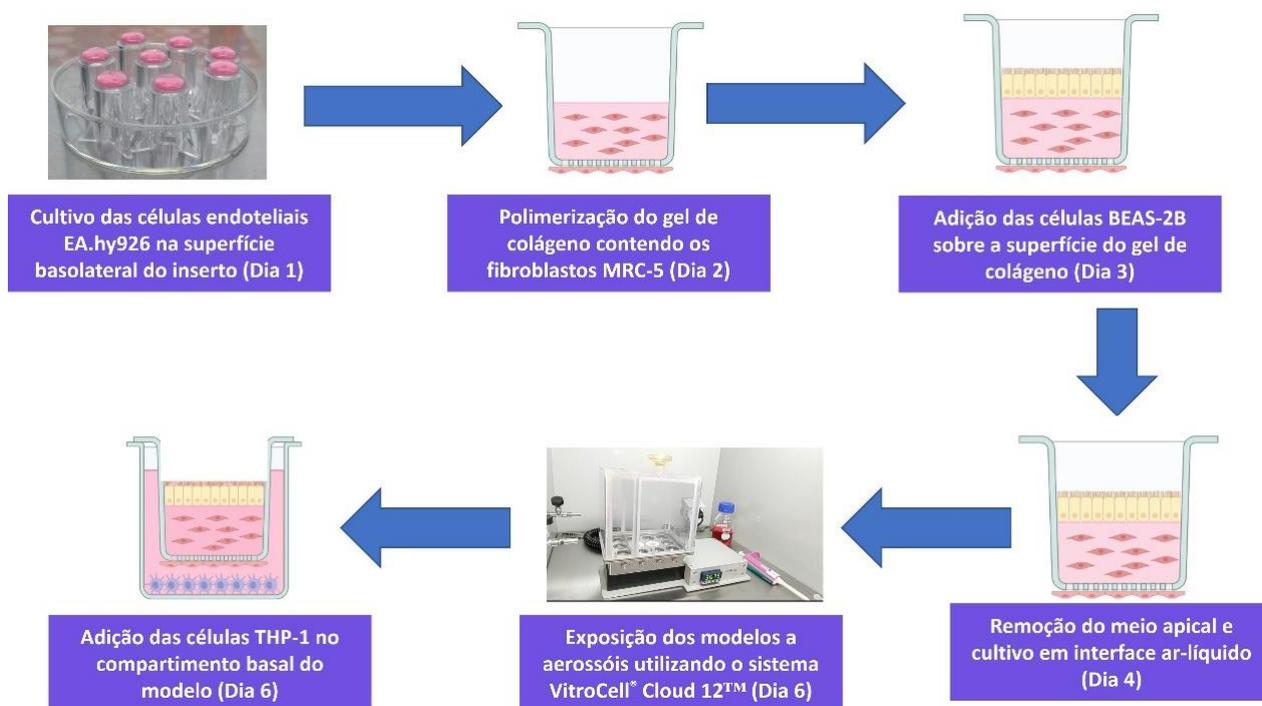
No dia 1 os insertos *transwell* semipermeáveis com área de  $0,33\text{cm}^2$  e poros com  $0,4\mu\text{m}$  de diâmetro (Greiner Bio-One, Germany) foram posicionados com a porção basolateral voltada para cima, de forma que as células endoteliais EA.hy926 foram adicionadas à porção basal da membrana semipermeável na densidade de  $6,0 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ , em um volume de  $100\mu\text{L}$ . Após a adição, os insertos foram mantidos em estufa de cultivo celular por 3-4 horas para adesão da camada endotelial, sendo que depois de transcorrido esse período, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e os insertos foram transferidos para placas de 24 poços contendo  $400\mu\text{L}$  de meio DMEM-LG suplementado com 10% de SFB, sendo cultivados *overnight*. No dia 2 procedeu-se com a montagem da camada de colágeno tipo I, de modo que os fibroblastos MRC-5 foram previamente coletados por trispinização, centrifugados a 1500RPM, contados em câmara de Neubauer e reservados em microtubos de  $1,5\text{mL}$ . Em seguida, o gel de colágeno foi preparado mediante a mistura de  $700\mu\text{L}$  da solução estoque de colágeno tipo I a  $3,57\text{mg/mL}$  (Gibco, Waltham, MA, EUA),  $100\mu\text{L}$  de meio DMEM 10x concentrado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA),  $28\mu\text{L}$  de solução de NaOH a 1M e  $172\mu\text{L}$  de água ultrapura, de modo a se obter uma concentração final de  $2,5\text{mg}$  de colágeno/ $\text{mL}$ . Após o preparo da mistura, a mesma foi adicionada sobre os fibroblastos MRC-5 previamente preparados e homogeneizada para dispersão das células dentro da matriz. Imediatamente em seguida,

foram transferidos 100µL da suspensão celular com a mistura ainda líquida para o interior dos insertos *transwell*, de modo que os fibroblastos permaneceram na densidade final de  $2,5 \times 10^3$  células/inserto, e as placas foram mantidas em estufa de cultivo celular por 30 minutos para a polimerização do gel. Transcorrido esse tempo, a superfície do gel foi lavada com 200µL de meio DMEM-LG e, por fim, adicionou-se 200µL de meio DMEM-LG suplementado com 10% de SFB sobre a superfície dos modelos, os quais foram cultivados em estufa por 24 horas previamente à execução das etapas subsequentes.

Depois de estabelecidas as camadas compostas pelas células endoteliais e fibroblastos, no dia 3 os modelos foram lavados por duas vezes com meio BEBM sem suplementação para remoção do SFB. Para tal, os mesmos foram incubados em estufa por 30 minutos após a adição de 500µL de meio BEBM no compartimento inferior e 200µL no compartimento superior dos insertos, de modo que o processo foi repetido por duas vezes consecutivas. Após as lavagens, adicionou-se à porção basal dos insertos 400µL de meio ALI (*Air-liquid Interface*), o qual foi usado para o cultivo dos modelos após a adição das células epiteliais, o qual consiste em uma mistura 1:1 dos meios BEBM:DMEM-HG suplementada com soro-albumina bovina (0,5mg/mL), extrato de pituitária bovina (10µg/mL), insulina (0,87µM), apo-transferrina (0,125µM), hidrocortisona (0,21µM), triiodotironina (0,01µM), epinefrina (2,7µM), fator de crescimento epidermal (EGF) (0,5ng/mL), ácido retinóico (0,05µM) e cloreto de cálcio (1mM).

Em seguida, as células epiteliais BEAS-2B foram coletadas por tripsinização, centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos e contadas, sendo ressuspensas em meio ALI e adicionadas sobre o gel de colágeno na densidade de  $1,0 \times 10^5$  células/inserto, no volume de 200µL. As células foram cultivadas de modo submerso por 24 horas e, posteriormente, o meio presente na superfície apical dos modelos foi removido para exposição das células epiteliais à interface ar-líquido no dia 4, de forma que os modelos foram cultivados para posterior caracterização e utilização nos experimentos de exposição a aerossóis de sensibilizantes respiratórios. Conforme ilustrado na Figura 16, o dia de montagem das camadas endotelial foi considerado como dia 1, de modo que o modelo foi mantido em cultura até o dia 8 para caracterização morfológica e fenotípica. Os experimentos de exposição a aerossóis de toxicantes foi realizado no dia 6, de modo que as células monocíticas THP-1 foram adicionadas à porção basal do modelo imediatamente após as exposições, na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/poço.

Figura 16: Fluxograma de obtenção dos modelos brônquicos 3D de co-cultura empregando as linhagens BEAS-2B, MRC-5, EA.hy926 e THP-1.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

### 3.8.1 – Caracterização histomorfológica do modelo 3D de co-cultura

Para a caracterização estrutural dos modelos de co-cultura, inicialmente os tecidos reconstruídos foram coletados em dias consecutivos e fixados em solução de paraformaldeído a 4% (pH 7,4) (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil). Após a fixação, a porção superior do modelo (células BEAS-2B e MRC-5) foi removida do inserto *transwell* e em seguida processada para avaliação histológica, sendo desidratada em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafanizada com xilol, impregnada e incluída em parafina, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Etapas do procedimento de processamento da porção superior do modelo 3D de co-cultura (células BEAS-2B e MRC-5) para avaliação histomorfológica.

<b>Etapa</b>	<b>Solução/reagente</b>	<b>Tempo</b>
<b>Desidratação</b>	Etanol 30%	30 minutos
	Etanol 50% I	30 minutos
	Etanol 50% II	30 minutos
	Etanol 60% I	30 minutos
	Etanol 60% II	30 minutos
	Etanol 70%	30 minutos
	Etanol 80%	30 minutos
	Etanol 95%	30 minutos
	Etanol Absoluto I	30 minutos
	Etanol Absoluto II	30 minutos
	Etanol Absoluto III	30 minutos
<b>Diafanização</b>	Xilol I	30 minutos
	Xilol II	30 minutos
<b>Impregnação</b>	Parafina I – 60°C	30 minutos
	Parafina II – 60°C	30 minutos
<b>Inclusão</b>	Parafina – temperatura ambiente	-

Após o processamento, os blocos foram seccionados em micrótomo (Leica Microsystems, Bannockburn, EUA), sendo obtidos cortes de 5µM de espessura. Os fragmentos foram posteriormente corados com Hematoxilina/Eosina e avaliados em microscópio óptico acoplado à câmera (DM 2000, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA).

### 3.8.2 - Caracterização fenotípica dos modelos 3D e de marcadores de dano tecidual por meio da técnica de imunofluorescência indireta

Além da caracterização estrutural, procedeu-se também com a avaliação da expressão dos biomarcadores teciduais  $\alpha$ -tubulina, pan-citoqueratina, E-caderina, MUC1 e CD31 no modelo reconstruído, bem como dos marcadores de dano tecidual caspase-3 ativa e NF-kB, empregando-se a técnica de imunofluorescência indireta. Para a caracterização

da porção superior dos modelos (células BEAS-2B e MRC-5), os tecidos foram previamente processados e incluídos em parafina, sendo posteriormente obtidos fragmentos de 5µm de espessura em micrótomo manual, conforme descrito na seção anterior. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em três banhos de Xilol e hidratados em soluções com concentração decrescente de etanol (100%, 95%, 80%, 70% e 50% - 5 minutos cada), sendo finalmente incubadas em PBS por 10 minutos. Após a etapa de hidratação, os cortes foram incubados em tampão citrato (10mM) por 30 minutos a 96°C para recuperação antigênica, sendo posteriormente incubados por 1 hora com solução de bloqueio (PBS acrescido de 1% de soro-albumina bovina e 0,1% de Tween 20). Posteriormente, os cortes foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C com o anticorpo primário correspondente a cada proteína avaliada, conforme descrito na Tabela 4. As lâminas foram então lavadas por 5 vezes em PBS e então incubadas com o anticorpo secundário conjugado a fluorocromo por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, o núcleo das células foi marcado com o corante Hoescht 33342 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) na concentração de 5ng/mL, sendo em seguida lavadas por 4 vezes e montadas com solução de 90% de glicerol e 10% de PBS para subseqüente análise em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA) acoplado ao software LAS-AF.

Tabela 4: Relação descritiva dos anticorpos utilizados para a caracterização do modelo 3D de co-cultura pela técnica de imunofluorescência indireta.

<b>Anticorpos primários</b>			
<b>Descrição</b>	<b>Espécie</b>	<b>Diluição utilizada</b>	<b>Fabricante</b>
Monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina	Coelho	1:100	Invitrogen
Monoclonal anti-pan-citoqueratina	Camundongo	1:100	Invitrogen
Monoclonal anti-E-caderina	Coelho	1:500	Invitrogen
Monoclonal anti-MUC1	Coelho	1:100	Invitrogen
Monoclonal anti-CD31	Camundongo	1:100	Invitrogen
Monoclonal anti-caspase 3 ativa	Coelho	1:100	BD Biosciences
Monoclonal anti-NF- $\kappa$ B	Camundongo	1:100	Cell Signalling
<b>Anticorpos secundários</b>			
Monoclonal anti-coelho conjugado ao AF488	Cabra	1:500	Invitrogen
Monoclonal anti-camundongo conjugado ao AF532	Cabra	1:500	Invitrogen

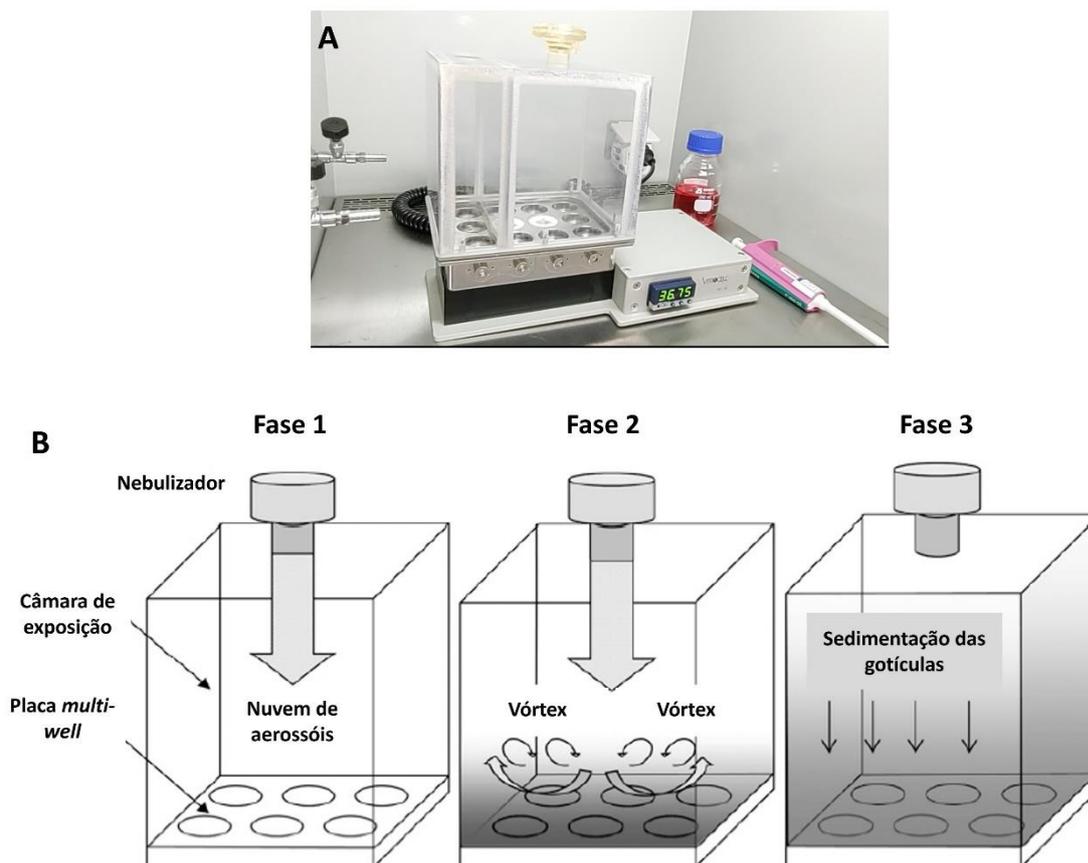
Por outro lado, para a caracterização da porção endotelial, os insertos foram lavados com PBS por 5 minutos e as células endoteliais aderidas à membrana semipermeável foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,1% preparada em PBS por 10 minutos. Após a permeação, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos e incubadas com solução de bloqueio (PBS acrescido de 1% de soro-albumina bovina e 0,1% de Tween 20) por 30 minutos. Em seguida, os insertos foram incubados com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -tubulina na concentração de 1:100 por 1 hora e lavados 3 vezes com PBS, sendo incubados

por 5 minutos em cada lavagem. Depois disso, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado ao AF488 por 1 hora em temperatura ambiente e em seguida procedeu-se com a marcação nuclear utilizando-se o corante Hoescht 33342 na concentração de 5ng/mL por 5 minutos. Por fim, as células foram novamente lavadas por 3 vezes e analisadas em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA).

### **3.9 - Padronização e dosimetria do sistema de nebulização VitroCell® Cloud 12™ para posterior exposição dos modelos 3D de co-cultura**

Além da exposição das células do sistema respiratório sob a forma de monocamada de forma submersa aos sensibilizantes pulmonares, no presente estudo foi avaliada também a exposição do modelo bronquial 3D a aerossóis desses toxicantes em interface ar-líquido, de modo a mimetizar de forma mais realística a exposição humana a substâncias químicas pela via inalatória. Para tal, foi utilizado o sistema VitroCell® Cloud 12™ (Figura 17), que possibilita a geração de aerossóis padronizados quanto ao tamanho de partículas e velocidade de deposição sobre modelos cultivados em interface ar-líquido. Esse sistema consiste em uma câmara com 12 orifícios para introdução de insertos *transwell*, acoplada a um sistema de geração aerossóis por malha vibratória, o qual proporciona a formação de uma nuvem homogeneamente dispersa no interior da câmara que se deposita de forma controlada sobre a superfície epitelial dos modelos, conforme demonstrado na Figura 17 (Lenz et al. 2014).

Figura 17: (A) Estrutura do sistema de nebulização VitroCell® Cloud 12™. (B) Representação esquemática dos processos de nebulização e deposição dos aerossóis gerados na câmara de exposição.



Fonte: Adaptado de Lenz et al.(2014).

Para a dosimetria do volume nebulizado pelo equipamento sobre os insertos *transwell*, procedeu-se com a quantificação de fluoresceína sódica nos diferentes orifícios da câmara, conforme procedimento recomendado pelo fabricante. Inicialmente, foram preparadas soluções-padrão de fluoresceína sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em DBPS (Gibico, Waltham, MA, EUA) em cinco concentrações (0,375 – 0,023 $\mu$ g/mL) mediante diluição seriada, das quais foram transferidos 70 $\mu$ L de cada para placas de 96 poços específicas para leitura de fluorescência (Corning, Nova York, EUA) em quadruplicata e a fluorescência foi medida em fluorímetro leitor de placas (FluoStar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, DE) nos comprimentos de onda de 490nm (excitação) e 520nm (emissão) para a obtenção da curva-padrão. Em seguida, o sistema Vitrocell® Cloud 12 foi montado e ligado, sendo previamente aquecido à temperatura de 37°C, sendo que todos os orifícios foram preenchidos com água destilada, de forma que o líquido não tocasse a

porção basolateral dos insertos. Posteriormente, foram posicionados insertos vazios em todos os orifícios da plataforma metálica, os quais foram preenchidos com 300µL de DPBS. Em seguida, foram nebulizados 200µL de solução de fluoresceína a 200µg/mL, de modo que a cada nebulização o tempo de deposição da nuvem de aerossóis foi padronizado em 10 minutos. Após a nebulização, a câmara foi aberta e foram coletados 200µL de líquido da porção central de cada inserto, os quais foram transferidos para microtubos de 1,5mL contendo 200µL de DPBS. Depois e homogeneizada, foram transferidos em quadruplicata 70µL/poço de cada solução coletada para placas de 96 poços e a fluorescência foi determinada em fluorímetro, nas mesmas condições descritas anteriormente. O procedimento descrito foi realizado por seis vezes consecutivas, de modo que a concentração de fluoresceína em cada inserto foi calculada utilizando-se a curva-padrão obtida na etapa anterior.

Após a determinação da concentração de fluoresceína em cada inserto, foi possível determinar o Fator de Deposição (FDep), calculado em relação ao valor teórico, bem como o Volume de Deposição (VDep) depositados em cada insertos. Dessa forma, para os experimentos conduzidos com os sensibilizantes respiratórios, a concentração de cada substância por cm<sup>2</sup> foi determinada com base no volume de deposição obtido nessa etapa.

### **3.10 - Exposição do modelo 3D de co-cultura a aerossóis do sensibilizante respiratório Anidrido Maleico e avaliação de parâmetros inflamatórios e funcionais**

Visando avaliar a aplicabilidade do modelo epitelial brônquico reconstruído para exposição a aerossóis de toxicantes inalados, o sensibilizante anidrido maleico foi escolhido com base nos resultados das etapas anteriores no estudo, uma vez que o mesmo induziu consistentemente alterações inflamatórias e funcionais nos modelos de cultivo celular em monocamada. Para tal, os modelos 3D foram obtidos conforme descrito no item 3.8 e expostos no dia 6 de cultivo, de forma que os insertos *transwell* foram transferidos para o sistema VitroCell Cloud 12 e expostos a aerossóis do toxicante anidrido maleico. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque do composto em DMSO na concentração de 400 mg/mL, a qual foi posteriormente diluída em PBS para a obtenção das soluções-uso. A concentração de cada solução nebulizada foi determinada conforme os estudos de volume de deposição, estabelecido conforme descrito na seção 3.9.

No momento da exposição, foram nebulizados 200µL de cada solução-uso, de forma que o processo foi repetido consecutivamente até se obter a concentração do composto desejada na superfície epitelial dos modelos. Entre as nebulizações, o tempo de deposição

da nuvem foi padronizado em 5 minutos, de modo que ao final de todas as nebulizações, aguardou-se 10 minutos antes de se remover os insertos do sistema. Como controle negativo e controle de veículo, foram nebulizados PBS e DMSO a 25%, respectivamente.

Após a exposição, os insertos foram transferidos para placas de 24 poços contendo em cada poço  $4,0 \times 10^5$  células THP-1 em meio ALI no volume final de 400  $\mu$ L. Por fim, os modelos foram cultivados por 24 horas pós-exposição, sendo então coletados para as avaliações de perfil inflamatório e dano tecidual, conforme descrito a seguir.

### 3.10.1 – Avaliação da viabilidade tecidual pelo método de redução do MTT

Após exposição aos aerossóis de anidrido maleico nas concentrações de 300, 150 and 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, os modelos foram cultivados por 24 horas, de modo que após isso, os insertos *transwell* foram transferidos para outra placa de 24 poços, contendo 500  $\mu$ L/poço de solução de MTT a 0,5mg/mL preparada em meio de cultura, a qual foi incubada em estufa de cultivo por 3 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi removida e os insertos foram incubados com Isopropanol (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil), sendo adicionados 500  $\mu$ L do solvente no compartimento basal e 300  $\mu$ L no compartimento apical. Subsequentemente, as placas foram incubadas em agitador orbital na rotação de 300 RPM por 3 horas, à temperatura ambiente, de modo que em seguida o isopropanol do compartimento apical foi transferido para o compartimento basal e homogeneizado. Por fim, o conteúdo dos poços foi transferido para placas de 96 poços (100  $\mu$ L/poço) e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro leitor de placas no comprimento de onda de 560nm (Figura 18). A viabilidade tecidual foi calculada em relação aos tecidos expostos ao controle negativo.

Após a obtenção dos valores de viabilidade tecidual para os tecidos nos quais foram avaliadas diferentes concentrações dos toxicantes, a CV<sub>80</sub> de cada substância-teste foi determinada utilizando-se a equação descrita abaixo.

$$\text{Log } CV_{80} = \frac{(80 - c) \times \log(b) - (80 - a) \times \log(d)}{a - c}$$

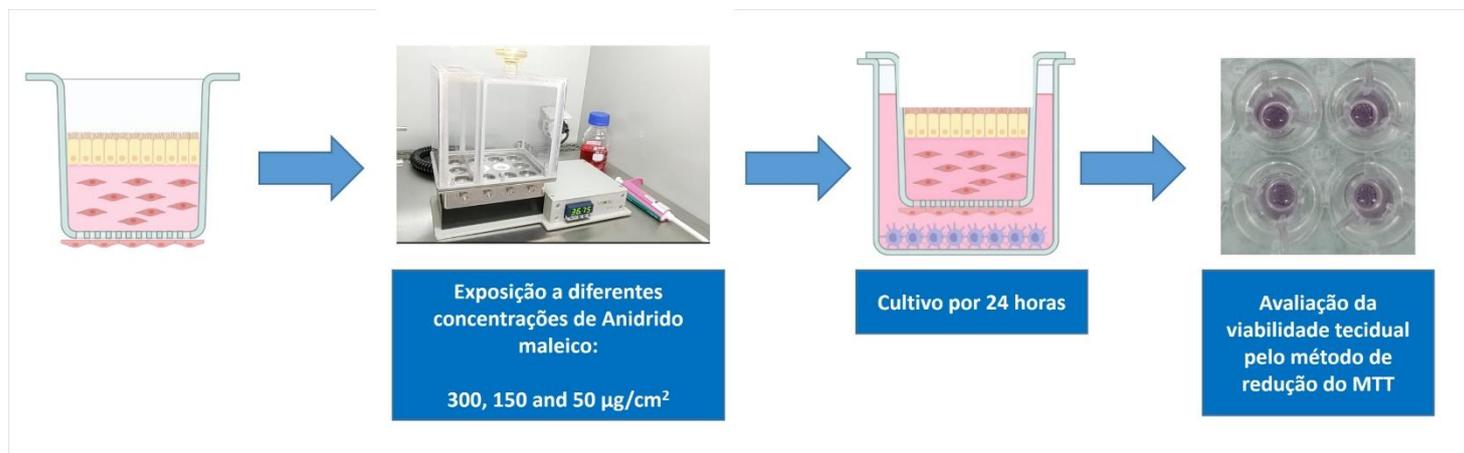
Onde:

a = valor mínimo de viabilidade tecidual acima de 80%;

c = valor máximo de viabilidade tecidual abaixo de 80%;

b e d = concentrações correspondentes aos valores de viabilidade tecidual representados por “a” e “c”, respectivamente.

Figura 18: Representação esquemática do ensaio de viabilidade tecidual do modelo brônquico 3D de co-cultura após exposição a aerossóis do sensibilizante anidrido maleico, por meio do ensaio de redução do MTT.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

Nessa etapa, verificou-se que a  $CV_{80}$  para o anidrido maleico sobre o modelo 3D de co-cultura foi de  $160\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Dessa forma, para as avaliações subsequentes, o tecido reconstruído foi exposto a três concentrações desse toxicante a partir da  $CV_{80}$  determinada ( $160$ ,  $80$ , e  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

### 3.10.2 – Avaliação do perfil de citocinas inflamatórias produzido pelo modelo 3D de co-cultura e pela linhagem THP-1

Após a determinação da viabilidade tecidual e da  $CV_{80}$  do anidrido maleico sobre o modelo de co-cultura, foram avaliadas tanto a produção global de citocinas inflamatórias quanto aquelas produzidas pela linhagem THP-1, visando investigar os efeitos pró-inflamatórios teciduais e referentes à modulação das células monocíticas, respectivamente. Para tal, os modelos foram expostos a três concentrações de anidrido maleico estabelecidas a partir da  $CV_{80}$  ( $160$ ,  $80$ , e  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e cultivados adicionalmente por 24 horas. Posteriormente, os inserts *transwell* foram removidos das placas e as células THP-1 foram coletadas em microtubos de  $1,5\text{mL}$ , sendo centrifugadas a  $1500\text{RPM}$  por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, o lisado das células THP-1 foi obtido e as concentrações das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-10 e TNF- $\alpha$  foram determinadas por meio do método de CBA, conforme também descrito na seção 3.4.

### 3.10.3 – Avaliação de estresse oxidativo epitelial

Após a exposição aos aerossóis de anidrido maleico (160, 80, e 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), os modelos foram cultivados por 24 horas e em seguida incubados com solução do corante diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) preparada a 50 $\mu\text{M}$  em meio de cultura, em estufa de cultivo celular por 1 hora. Em seguida, os tecidos foram fixados com solução de paraformaldeído a 4% por 1 hora em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo posteriormente transferidos para moldes contendo meio O.C.T. (Sakura, Nagano, Japão) e fixados com nitrogênio líquido. Foram obtidos cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura dos tecidos criopreservados empregando-se criostato (Leica Microsystems, Bannockburn, EUA), os quais foram transferidos para lâminas de microscopia e marcados com o corante Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por cinco minutos para possibilitar a visualização do núcleo celular. Após a marcação, as lâminas foram lavadas por duas vezes com PBS, montadas com o composto FluMount<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e analisadas em microscópio de fluorescência (DMI 4000B, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA). Após a obtenção das fotomicrografias, a fluorescência foi quantificada utilizando-se o software ImageJ (Bethesda, Maryland, USA), de modo a permitir comparações quantitativas entre os tecidos expostos e não expostos ao sensibilizante respiratório.

### 3.10.4 – Avaliação dos marcadores de dano tecidual/inflamação caspase-3 ativa, MUC1 e NF-kB

Após exposição ao anidrido maleico nas concentrações de 160, 80, e 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% e posteriormente processados para inclusão em parafina, conforme descrito no item 3.8.1. Em seguida, os tecidos foram seccionados a 5 $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo manual, sendo posteriormente corados com hematoxilina-eosina para avaliação histológica e submetidos à técnica de imunofluorescência indireta para avaliação dos marcadores caspase-3 ativa, MUC1 e NF-kB, de acordo com o apresentado nos itens 3.8.1 e 3.8.2. Para os tecidos submetidos à técnica de imunofluorescência, a fluorescência referente a cada tecido foi quantificada nas fotomicrografias utilizando-se o software ImageJ (Bethesda, Maryland, USA).

### 3.11 – Obtenção do modelo epitelial brônquico utilizando como *scaffold* a parede brônquica suína descelularizada

Como última etapa do presente trabalho, foi proposto o desenvolvimento de uma matriz oriunda da parede brônquica suína, a qual foi descelularizada, caracterizada e repovoada com as células epiteliais brônquicas Calu-3.

Os pulmões suínos utilizados no estudo foram doados pelo Frigorífico Caçula (Goiânia, GO, Brasil), os quais foram coletados pelos funcionários do abatedouro imediatamente após o abate. Após a coleta, os órgãos foram imersos em PBS gelado e transportados sob resfriamento até as dependências do laboratório. Os pulmões foram dissecados de forma a permitir a separação dos brônquios principais direito e esquerdo, em uma extensão de cerca de 10-12 cm (Figura 19). Depois de obtidos, os brônquios foram seccionados longitudinalmente e fragmentos de 6 mm de diâmetro foram obtidos utilizando bisturi circular, sendo que os blocos de cartilagem foram removidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi N° 11. Os fragmentos foram analisados macroscopicamente antes e depois dos processos de descelularização em estereomicroscópio MZ6 (Leica Microsystems, Bannockburn, EUA). Todos os processos de lavagem foram conduzidos em cabine de fluxo laminar, utilizando soluções e recipientes estéreis para minimizar a contaminação dos fragmentos e viabilizar o cultivo celular na etapa de rescelularização da matriz.

Figura 19: Processo de obtenção dos fragmentos de parede brônquica suína a serem submetidos aos diferentes processos de descelularização.



Fonte: SILVA, 2022.

### 3.11.1 – Descelularização por detergentes

Nessa abordagem, foi avaliada a eficiência de diferentes surfactantes na remoção celular dos fragmentos brônquicos. Para tal, os tecidos foram incubados sob agitação por 24 horas com solução de lauril sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 1%, SDS 0,5% ou Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a incubação, os tecidos foram lavados por seis vezes em PBS, sendo cada lavagem conduzida por 12 horas para a total remoção dos detergentes.

### 3.11.2 – Descelularização por gradiente osmótico associado a detergentes

Nesse método, os tecidos foram inicialmente tratados com tampão hipotônico (Tris 10 mM, pH 8,0) por 24 horas, seguindo-se com a incubação com tampão hipertônico (Triton X-100 1%, KCl 1.5M, Tris 10mM, pH 8,0) por mais 24 horas, ambos os processos sob agitação a 4°C. Posteriormente, os tecidos foram incubados com o tampão de extração (SDS 1%, Tris 10mM, pH 9,0) por 24 horas sob agitação em temperatura ambiente. A remoção do SDS foi feita mediante tratamento dos fragmentos com solução de Triton X-100 1%, por meio de incubação a 37°C por 30 minutos. Por fim, os tecidos foram lavados com PBS por 3 vezes, cada lavagem durando 24 horas, sob agitação a temperatura ambiente.

### 3.11.3 – Descelularização por NaCl associado a DNase/RNase

Inicialmente, os fragmentos foram incubados sob agitação por 48 horas com solução de NaCl 1,5M, trocando-se a solução a cada 24 horas. Em seguida, os tecidos foram tratados com solução de nucleases (DNase 5 U/mL; RNase 100µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 48 horas em temperatura ambiente. Por fim, os fragmentos foram submetidos a 3 lavagens com PBS, o qual foi trocado a cada 24 horas, sob agitação.

### 3.11.4 – Caracterização histomorfológica dos fragmentos descelularizados e avaliação dos componentes da matriz extracelular

Após os processos de descelularização, os tecidos foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados para posterior inclusão em parafina, conforme descrito no item 3.8.1. Depois de incluídos, foram obtidos cortes de 5µm de espessura em micrótomo manual, os quais foram submetidos a diferentes processos de coloração para avaliação da estrutura e dos componentes teciduais da matriz descelularizada. A

conformação estrutural geral dos fragmentos foi avaliada mediante coloração com hematoxilina-eosina.

Para avaliação das fibras colágenas, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções com concentração crescente de etanol e incubados em água destilada por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com solução Azan Heidenhain modificada por 10 minutos, lavadas em dois banhos de etanol a 50%, desidratadas e montadas com lamínula. As lâminas foram avaliadas por microscopia óptica, de forma que o resultado final permitiu observar fibras colágenas coradas em azul.

A marcação de glicosaminoglicanos (GAGs) nos tecidos, por outro lado, foi feita mediante coloração por azul de alcian. Para tal, os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados com solução de azul de alcian a 1% por 10 minutos. Os cortes foram ainda contra-corados com hematoxilina por 30 segundos, lavados em água corrente por 5 minutos, desidratados e montados pra avaliação por microscopia óptica. O resultado demonstrou a presença de GAGs nos tecidos mediante coloração azul-clara, de modo que o núcleo celular, quando presente, foi corado em púrpura pela hematoxilina.

#### 3.11.5 – Avaliação da presença de conteúdo celular nos fragmentos mediante marcação com Hoechst 33342

Para verificar a persistência de material celular nos tecidos submetidos à descclularização, utilizou-se o corante Hoechst 33342, o qual se liga especificamente ao DNA e emite fluorescência azul quando excitado pela luz ultravioleta. Dessa forma, visando verificar a existência de material genético nas matrizes submetidas aos diferentes processos de descclularização, os tecidos incluídos em parafina foram desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações crescentes de etanol e, por fim, incubados em PBS por 10 minutos. Em seguida, foram marcados com solução do corante Hoechst a 5µg/mL por 5 minutos, lavados com PBS e avaliados em microscópio de fluorescência (DMI 4000B Leica Microsystems, Bannockburn, EUA).

#### 3.11.6 – Teste de esterilidade com os fragmentos após o processo de descclularização

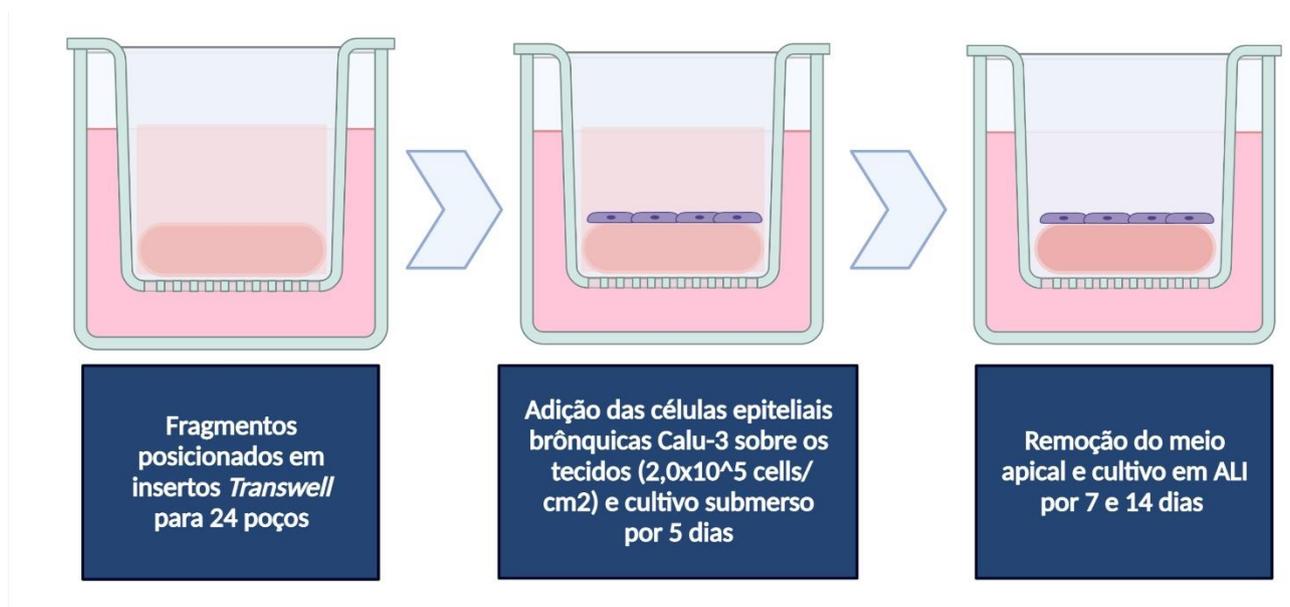
Para garantir a qualidade microbiológica das matrizes obtidas, após o processo de descclularização os fragmentos foram incubados por 5 horas em meio de biópsia, composto por meio DMEM contendo 2% de Penicillina/Estreptomicina e 2,5µg/mL de anfotericina B, em estufa de cultivo celular a 37°C. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para placas de 24 poços contendo 1mL/poço de meio de cultura sem antibióticos, no qual foram

mantidos a 37°C por 48 horas. Os poços foram visualmente avaliados para verificar quaisquer sinais de crescimento microbiano, e foram utilizados nas etapas posteriores apenas tecidos negativos para o teste microbiológico.

### 3.11.7 – Obtenção do modelo epitelial brônquico utilizando a matriz descelularizada como *scaffold* para cultivo em interface ar-líquido (ALI)

Após a avaliação dos diferentes métodos de descelularização da matriz brônquica suína, optou-se por prosseguir com os estudos de repovoamento tecidual utilizando-se os fragmentos produzidos empregando-se a solução de SDS a 1%. Para tal, os fragmentos foram produzidos conforme descrito na seção 3.11.1, submetidos ao teste de esterilidade e então transferidos para placas de 24 poços contendo insertos *transwell* semipermeáveis com área de 0,33cm<sup>2</sup> e poros com 0,4µm de diâmetro (Greiner Bio-One, Germany). Os insertos foram posicionados de forma que o compartimento basal foi preenchido com 400µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de Penicillina/Estreptomicina, 1% de aminoácidos não-essenciais e piruvato de sódio (1mM). Posteriormente, as células Calu-3, cultivadas conforme previamente descrito no item 3.1, foram coletadas por tripsinização, de modo que uma suspensão celular foi preparada na concentração de 3,3x10<sup>5</sup> células/mL, da qual foram adicionados na superfície de cada tecido 200µL, obtendo-se uma densidade celular final de 2.0x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>. As células foram cultivadas de forma submersa por 5 dias, sendo que, no sexto dia, o meio apical foi removido dos insertos e as células seguiram com o cultivo em ALI por até 14 dias, sendo que durante esse último período, as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 2% de SFB (Figura 20). O meio dos insertos foi trocado a cada dois dias durante todo o período de cultivo.

Figura 20: Representação esquemática da obtenção dos modelos epiteliais brônquicos utilizando as células Calu-3 cultivadas em interface ar-líquido (ALI) sobre o *bioscaffold* oriundo da matriz brônquica suína descelularizada.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

### 3.11.8 – Estudos de caracterização morfológica e fenotípica das células epiteliais brônquicas cultivadas na matriz descelularizada

Visando avaliar a biocompatibilidade e o comportamento das células Calu-3 sobre o *scaffold* produzido, após o cultivo por 7 e 14 dias em interface ar-líquido os tecidos foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados para avaliação histológica, conforme previamente descrito no item 3.8.1. O ensaio de imunofluorescência indireta foi conduzido conforme apresentado no tópico 3.8.2 para avaliar qualitativamente a expressão dos marcadores pan-citoqueratina, MUC5AC, E-caderina e colágeno IV nos tecidos reconstruídos, de forma a verificar se o repovoamento do tecido brônquico ocorreu de forma bem sucedida, bem como se as células Calu-3 não passaram por processos de diferenciação ou desdiferenciação durante o período de cultivo sobre o *bioscaffold*.

### 3.12 – Análise estatística

Os resultados do estudo foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos nos diferentes experimentos, de forma que para cada parâmetro analisado foram realizados três ensaios independentes em triplicata. Os ensaios de citotoxicidade foram avaliados mediante aplicação do modelo de regressão não-linear para a determinação dos

valores de  $CV_{80}$  e  $CI_{50}$ . Para os demais ensaios, o teste t de Student foi utilizado para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados, de modo que valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes aplicando-se um intervalo de confiança de 95%. As análises foram conduzidas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA).

### Artigo 1

<b>Título</b>	New approach methodologies applied to preclinical respiratory research: the role in translational medicine from bench-to-bedside.
<b>Autores</b>	Artur Christian Garcia da Silva; Marize Campos Valadares.

### Artigo 2

<b>Título</b>	Chemical respiratory allergy: The contribution of non-immune respiratory system cells to the inflammatory framework of occupational asthma.
<b>Autores</b>	Artur Christian Garcia da Silva; Sérgio de Moraes Carvalho Filho; Izadora Caroline Furtado de Mendonça; Marize Campos Valadares.

### Artigo 3

<b>Título</b>	Assessment of dendritic cell participation in chemical respiratory allergy.
<b>Autores</b>	Artur Christian Garcia da Silva; Sérgio de Moraes Carvalho Filho; Marize Campos Valadares.

### Artigo 4

<b>Título</b>	Characterization and applicability of a novel physiologically relevant 3D-tetraculture bronchial model for in vitro assessment of chemical respiratory allergy
<b>Autores</b>	Artur Christian Garcia da Silva, Izadora Caroline Furtado de Mendonça, Marize Campos Valadares

### Artigo 5

<b>Título</b>	Development of a biologically-inspired airway epithelial model using a bronchial decellularized scaffold: applicability for pulmonary preclinical studies
<b>Autores</b>	Artur Christian Garcia da Silva, Sérgio de Moraes Carvalho Filho, Izadora Caroline Furtado de Mendonça, Tatyane Gonçalves Hayasaki, Marize Campos Valadares

Dadas as limitações metodológicas atualmente disponíveis para avaliação pré-clínica de sensibilizantes respiratórios de baixo peso molecular, o presente trabalho se propôs a realizar uma avaliação multiparamétrica da resposta humana *in vitro* a essa classe de toxicantes, bem como aplicar diferentes estratégias de bioengenharia para obtenção de modelos com diferentes níveis de complexidade para esse fim. Mediante a avaliação de células não-imunológicas, verificou-se que os alérgenos químicos induziram diferentes alterações inflamatórias e funcionais dos distintos tipos celulares avaliados. Após exposição a concentrações sub-citotóxicas, as células epiteliais brônquicas aumentaram a produção de IL-8 e reduziram a expressão da proteína MUC1, que por sua vez está relacionada a vias de sinalização anti-inflamatórias. Os fibroblastos pulmonares também apresentaram aumento na produção de IL-8. As células endoteliais, por outro lado, sofreram incremento na produção de IL-6 após exposição à maioria das substâncias avaliadas, demonstrando ainda um perfil de ativação que foi demonstrado por meio do aumento da expressão da molécula de adesão ICAM-1. Em conjunto, esses resultados demonstram a participação de células não inflamatórias no arcabouço mecanístico do processo de sensibilização pulmonar, mostrando ativação de elementos da resposta imune inata que certamente podem contribuir para a via de efeito adverso desse desfecho.

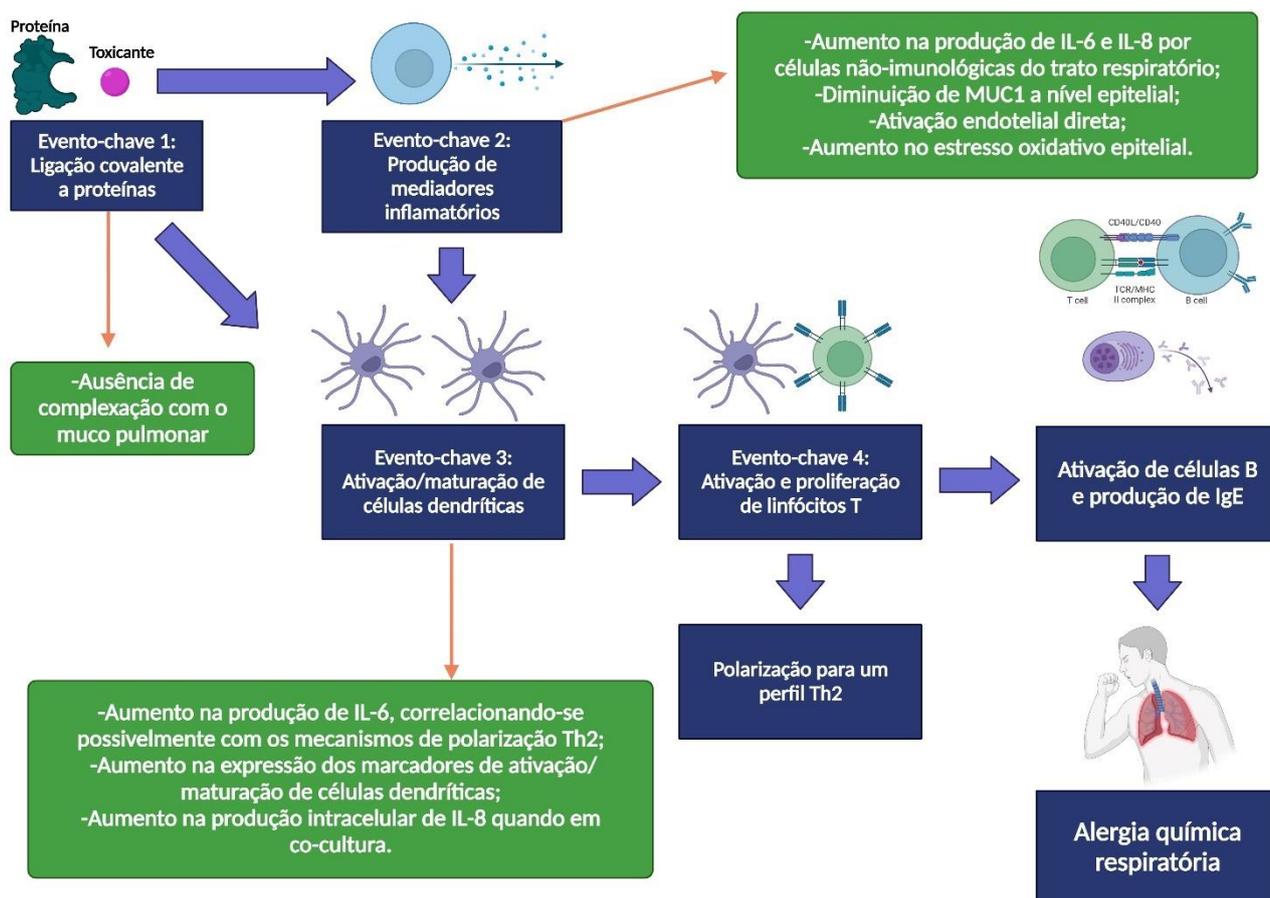
Com relação à linhagem THP-1, utilizada como modelo experimental de células dendríticas, a mesma também respondeu à ação direta dos sensibilizantes respiratórios mediante aumento da expressão dos biomarcadores de ativação/maturação CD86, HLA-DR e CD11c. Além disso, foi constatado ainda um aumento na produção de IL-6 em resposta a tal exposição, o que corrobora com a ativação de vias de sinalização que contribuem para a polarização de um perfil de resposta Th2 a nível de ativação de linfócitos T.

Ademais, mediante avaliação da interação entre os sensibilizantes químicos e a proteína mucina, principal componente proteico do muco pulmonar, apesar de alguns toxicantes interagirem com essa biomolécula, tal interação não foi predominante para todas as entidades químicas avaliadas, demonstrando que muito provavelmente esse alvo não

interfere significativamente em níveis toxicocinético e toxicodinâmico na resposta a tal exposição.

Ademais, após a integração dos diferentes tipos celulares avaliados em um único modelo 3D brônquico de co-cultura, verificou-se que o mesmo apresentou biomarcadores teciduais fenotípicos característicos do epitélio respiratório humano (MUC1, E-caderina e citoqueratina). Além disso, após exposição a aerossóis padronizados do sensibilizante anidrido maleico, o modelo permitiu ainda a mensuração de parâmetros relacionados à resposta brônquica a alérgenos de baixo peso molecular. Nessa etapa, foram verificados o aumento global na produção das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8. Com relação à porção epitelial, foram observados o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, o qual provavelmente pode ser associado ao aumento atividade de caspase-3 também constatado, bem como diminuição da expressão do biomarcador anti-inflamatório MUC-1, características comumente encontradas no segmento brônquico de pacientes asmáticos. Além disso, foi observado ainda um aumento na produção de IL-8 pelas células monocíticas THP-1 presentes no compartimento basal do modelo, demonstrando a participação desse tipo celular empregado como modelo de células dendríticas (Figura 21).

Figura 21: Descrição sumarizada das principais contribuições do presente estudo para a elucidação da via de efeito adverso da alergia química respiratória.



Fonte: SILVA, 2022.

Criado na plataforma BioRender.com

Além disso, o modelo de co-cultura desenvolvido permitiu agregar diferentes parâmetros cruciais para a elaboração de uma resposta relevante que reflita a exposição do trato respiratório a toxicantes inalados. Dentre eles, pode-se destacar a possibilidade de cultivo em interface ar-líquido, que por sua vez viabilizou a exposição a aerossóis diretamente sobre a superfície epitelial; a integração dos principais tipos celulares envolvidos na resposta tecidual a alérgenos de baixo peso molecular, incluindo tanto células de barreira, estruturais e imunológicas; a avaliação do microambiente tecidual global, resultante da comunicação intercelular.

Por fim, o estudo gerou ainda como produto um *bioscaffold* oriundo da matriz brônquica suína descelularizada que possibilitou o ancoramento, crescimento e diferenciação das células epiteliais brônquicas Calu-3. Dentre as diferentes técnicas avaliadas, verificou-se que a grande maioria preservou os elementos da matriz extracelular (colágeno, glicosaminoglicanos e membrana basal), de forma que o método de remoção dos componentes celulares por SDS 1% foi selecionado devido ao baixo custo, menor tempo de execução e preservação dos componentes teciduais. Os tecidos obtidos foram repovoados com as células Calu-3, as quais apresentaram crescimento progressivo após 7 e 14 dias em interface ar-líquido, expressando regularmente os biomarcadores citoqueratina, MUC5AC e E-caderina, demonstrando que a matriz se mostrou biocompatível, bem como possibilitou a proliferação e diferenciação celular. Tal modelo pode ser aplicável para futuras exposições a toxicantes inalados, também em interface ar-líquido, possibilitando recriar um modelo *in vitro* que reflete de forma mais representativa o microambiente brônquico humano.

Portanto, ao término do estudo conclui-se que modelos oriundos de diferentes níveis de complexidade podem ser aplicados de forma bem-sucedida para avaliação do potencial sensibilizante de alérgenos respiratórios. Os resultados obtidos no presente trabalho subsidiam tanto as bases mecanísticas da fisiopatologia da alergia química respiratória, que podem ser utilizadas na construção dessa via de efeito adverso, como demonstra a aplicabilidade de modelos *in vitro* que fornecem parâmetros mensuráveis para avaliação pré-clínica de toxicantes inalados.

ALSAFADI, Hani N. et al. Applications and approaches for three-dimensional precision-cut lung slices. Disease modeling and drug discovery. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 62, n. 6, p. 681-691, 2020.

AOP Wiki. AOPs (2022). Disponível em: <https://aopwiki.org/aops>. Acesso em 09 ago. 2022.

ARTS, Josje HE; KUPER, C. Frieke. Animal models to test respiratory allergy of low molecular weight chemicals: a guidance. **Methods**, v. 41, n. 1, p. 61-71, 2007.

ARTS, Josje HE et al. The respiratory local lymph node assay as a tool to study respiratory sensitizers. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 2, p. 423-434, 2008.

ARTS, Josje. How to assess respiratory sensitization of low molecular weight chemicals?. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 225, p. 113469, 2020.

ASHIKAGA, Takao et al. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 38, n. 4, p. 275-284, 2010.

ATTAFI, Ibraheem M.; BAKHEET, Saleh A.; KORASHY, Hesham M. The role of NF- $\kappa$ B and AhR transcription factors in lead-induced lung toxicity in human lung cancer A549 cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 30, n. 3, p. 197-207, 2020.

BALLESTER, Beatriz; MILARA, Javier; CORTIJO, Julio. The role of mucin 1 in respiratory diseases. **European Respiratory Review**, v. 30, n. 159, 2021.

BARKAUSKAS, Christina E. et al. Lung organoids: current uses and future promise. **Development**, v. 144, n. 6, p. 986-997, 2017.

BASKETTER, David; POOLE, Alan; KIMBER, Ian. Behaviour of chemical respiratory allergens in novel predictive methods for skin sensitisation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 86, p. 101-106, 2017.

BAXTER, Andrew et al. Targeted omics analyses, and metabolic enzyme activity assays demonstrate maintenance of key mucociliary characteristics in long term cultures of reconstituted human airway epithelia. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 5, p. 864-875, 2015.

BERTHIAUME, François; MAGUIRE, Timothy J.; YARMUSH, Martin L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 2, p. 403-430, 2011.

BÉRUBÉ, Kelly A. Alternatives for Lung Research: Stuck between a Rat and a Hard Place: The Twelfth FRAME Annual Lecture (the Sixth Bill Annett Lecture) presented at the Kennel

Club, London, on 4 November 2010. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 39, n. 2, p. 121-130, 2011.

BEQUIGNON, Emilie et al. FcRn-dependent transcytosis of monoclonal antibody in human nasal epithelial cells in vitro: A prerequisite for a new delivery route for therapy?. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1379, 2019.

BEUBLER, Eckhard et al. Influence of the surfactant tyloxapol on mucociliary clearance in human respiratory cystic fibrosis cells. **Pharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 1-3, 2016.

BOEI, Jan JWA et al. Xenobiotic metabolism in differentiated human bronchial epithelial cells. **Archives of toxicology**, v. 91, n. 5, p. 2093-2105, 2017.

CAO, Xuefei et al. Cigarette whole smoke solutions disturb mucin homeostasis in a human in vitro airway tissue model. **Toxicology**, v. 409, p. 119-128, 2018.

CHARY, Aline et al. An in vitro coculture system for the detection of sensitization following aerosol exposure. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 36, n. 3, p. 403-418, 2019.

CLIPPINGER, Amy J. et al. Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: An international workshop report. **Toxicology In Vitro**, v. 48, p. 53-70, 2018.

COLLIN, Matthew; BIGLEY, Venetia. Human dendritic cell subsets: an update. **Immunology**, v. 154, n. 1, p. 3-20, 2018.

COZENS, Daniel et al. Temporal differentiation of bovine airway epithelial cells grown at an air-liquid interface. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

CRAPO, Peter M.; GILBERT, Thomas W.; BADYLAK, Stephen F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

DANOV, Olga et al. Human lung tissue provides highly relevant data about efficacy of new anti-asthmatic drugs. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0207767, 2018.

DE ÁVILA, Renato Ivan; LINDSTEDT, Malin; VALADARES, Marize Campos. The 21st Century movement within the area of skin sensitization assessment: From the animal context towards current human-relevant in vitro solutions. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 108, p. 104445, 2019.

DE SERVI, Barbara; RANZINI, Francesco; PIQUÉ, Núria. Protective barrier properties of Rhinosectan® spray (containing xyloglucan) on an organotypic 3D airway tissue model (MucilAir): Results of an in vitro study. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2017.

DEARMAN, R. J. et al. Comparison of cytokine secretion profiles provoked in mice by glutaraldehyde and formaldehyde. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 29, n. 1, p. 124-132, 1999.

- DEARMAN, R. J.; BASKETTER, D. A.; KIMBER, I. Inter-relationships between different classes of chemical allergens. **Journal of applied toxicology**, v. 33, n. 7, p. 558-565, 2013.
- DENG, Ying et al. A THP-1 Cell Line-Based Exploration of Immune Responses Toward Heat-Treated BLG. **Frontiers in nutrition**, v. 7, p. 612397, 2021.
- DIK, Sander et al. Development of an in vitro test to identify respiratory sensitizers in bronchial epithelial cells using gene expression profiling. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 274-280, 2015.
- DYE, Briana R. et al. A bioengineered niche promotes in vivo engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. **Elife**, v. 5, p. e19732, 2016.
- EC – European Commission (2006). Regulation (EC) No 1907/ 2006.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2016. In: New Approach Methodologies in Regulatory Science Proceedings of a scientific workshop, Helsinki.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017. In: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint Specific Guidance. Version 6.0. July 2017.
- ENOCH, S. J. et al. Development of mechanism-based structural alerts for respiratory sensitization hazard identification. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 11, p. 2490-2498, 2012.
- FERREIRA, Isabel et al. Nature and kinetics of redox imbalance triggered by respiratory and skin chemical sensitizers on the human monocytic cell line THP-1. **Redox biology**, v. 16, p. 75-86, 2018.
- FITZGERALD, Rex E. Adverse outcome pathway bridge building from research to regulation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 849-851, 2020.
- FIZEŞAN, Ionel et al. In vitro exposure of a 3D-tetraculture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires. **Particle and fibre toxicology**, v. 16, n. 1, p. 1-21, 2019.
- FORRERYD, Andy et al. Prediction of chemical respiratory sensitizers using GARD, a novel in vitro assay based on a genomic biomarker signature. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0118808, 2015.
- FOSTER, Kimberly A. et al. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 208, n. 1-2, p. 1-11, 2000.
- FROST, Timothy S. et al. Permeability of epithelial/endothelial barriers in transwells and microfluidic bilayer devices. **Micromachines**, v. 10, n. 8, p. 533, 2019.
- FROST, Timothy S.; JIANG, Linan; ZOHAR, Yitshak. Pharmacokinetic analysis of epithelial/endothelial cell barriers in microfluidic bilayer devices with an air-liquid interface. **Micromachines**, v. 11, n. 5, p. 536, 2020.

FURUBAYASHI, Tomoyuki et al. Comparison of various cell lines and three-dimensional mucociliary tissue model systems to estimate drug permeability using an in vitro transport study to predict nasal drug absorption in rats. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 79, 2020.

GILPIN, Anna; YANG, Yong. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

GOULD, Barbara E.; DYER, Ruthanna. **Pathophysiology for the Health Professions-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2010.

GRIMM, David. U.S. EPA to eliminate all mammal testing by 2035. *Science*. 2019. Disponível em: <https://www.science.org/content/article/us-epa-eliminate-all-mammal-testing-2035#:~:text=The%20U.S.%20Environmental%20Protection%20Agency,studies%20on%20mammals%20by%202035..> Acesso em 10 ago. 2022.

HARTL, Dominik et al. Innate immunity of the lung: from basic mechanisms to translational medicine. **Journal of innate immunity**, v. 10, n. 5-6, p. 487-501, 2018.

HE, Rui-Wen et al. Comparative toxicity of ultrafine particles around a major airport in human bronchial epithelial (Calu-3) cell model at the air-liquid interface. **Toxicology in vitro**, v. 68, p. 104950, 2020.

HELOU, Doumet Georges et al. Nrf2 involvement in chemical-induced skin innate immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1004, 2019.

HILTON, J. et al. Identification of chemical respiratory allergens: Dose-response relationships in the mouse IgE test. **Toxicology Methods**, v. 5, n. 1, p. 51-60, 1995.

HIEMSTRA, Pieter S. et al. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. **Toxicology in vitro**, v. 47, p. 137-146, 2018.

HOLGATE, Stephen T.; POLOSA, Riccardo. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218-230, 2008.

HOLGATE, Stephen T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 673-683, 2012.

HOPKINS, Josephine E. et al. Selective haptentation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. **Chemical research in toxicology**, v. 18, n. 2, p. 375-381, 2005.

HU, Yan et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is critical for regenerative potential of distal lung epithelial progenitor cells in homeostasis and emphysema. **Stem Cells**, v. 38, n. 11, p. 1467-1478, 2020.

HUH, Dongeun et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1662-1668, 2010.

IMURA, Yuki; SATO, Kiichi; YOSHIMURA, Etsuro. Micro total bioassay system for ingested substances: assessment of intestinal absorption, hepatic metabolism, and bioactivity. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 24, p. 9983-9988, 2010.

JIAO, Bo et al. Toluene diisocyanate-induced inflammation and airway remodeling involves autophagy in human bronchial epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 70, p. 105040, 2021.

JUNQUEIRA, Luiz; CARNEIRO, José. Histologia Básica. 12a. **Rio de Janeiro, RJ**, 2013.

KATO, Kosuke et al. MUC1: the first respiratory mucin with an anti-inflammatory function. **Journal of clinical medicine**, v. 6, n. 12, p. 110, 2017.

KEANE, Timothy J.; SWINEHART, Ilea T.; BADYLAK, Stephen F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, v. 84, p. 25-34, 2015.

KENNEDY, Joshua L. et al. Acetaminophen is both bronchodilatory and bronchoprotective in human precision cut lung slice airways. **Xenobiotica**, v. 49, n. 9, p. 1106-1115, 2019.

KIMBER, Ian et al. Chemical respiratory allergy: reverse engineering an adverse outcome pathway. **Toxicology**, v. 318, p. 32-39, 2014.

KIMBER, Ian; POOLE, Alan; BASKETTER, David A. Skin and respiratory chemical allergy: confluence and divergence in a hybrid adverse outcome pathway. **Toxicology Research**, v. 7, n. 4, p. 586-605, 2018.

KIMURA, Hiroshi; SAKAI, Yasuyuki; FUJII, Teruo. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2018.

KLEIN, Sebastian G. et al. An improved 3D tetra-culture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. **Particle and fibre toxicology**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2013.

KOBAYASHI, Yoshihiko et al. Persistence of a regeneration-associated, transitional alveolar epithelial cell state in pulmonary fibrosis. **Nature cell biology**, v. 22, n. 8, p. 934-946, 2020.

KRUTZ, Nora L. et al. Critical evaluation of low-molecular weight respiratory sensitizers and their protein reactivity potential toward lysine residues. **Toxicological Sciences**, v. 182, n. 2, p. 346-354, 2021.

LALKO, Jon F. et al. The selective peptide reactivity of chemical respiratory allergens under competitive and non-competitive conditions. **Journal of immunotoxicology**, v. 10, n. 3, p. 292-301, 2013.

LANGE, Robert W. et al. Toluene diisocyanate colocalizes with tubulin on cilia of differentiated human airway epithelial cells. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 64-71, 1999.

LAMBRECHT, Bart N.; HAMMAD, Hamida; FAHY, John V. The cytokines of asthma. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 975-991, 2019.

- LANGER, Robert; VACANTI, Joseph. Advances in tissue engineering. **Journal of pediatric surgery**, v. 51, n. 1, p. 8-12, 2016.
- LEE, Young Mok et al. Exposure to toluene diisocyanate (TDI) induces IL-8 production from bronchial epithelial cells: effect of pro-inflammatory cytokines. **Journal of Korean medical science**, v. 18, n. 6, p. 809-812, 2003.
- LEE, Seung Hwan; SUNG, Jong Hwan. Organ-on-a-chip technology for reproducing multiorgan physiology. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 2, p. 1700419, 2018.
- LEIBEL, Sandra Lawrynowicz et al. Reversal of surfactant protein B deficiency in patient specific human induced pluripotent stem cell derived lung organoids by gene therapy. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- LENZ, Anke-Gabriele et al. Efficient bioactive delivery of aerosolized drugs to human pulmonary epithelial cells cultured in air-liquid interface conditions. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 51, n. 4, p. 526-535, 2014.
- LEPOITTEVIN, Jean-Pierre. Metabolism versus chemical transformation or pro-versus prehapten?. **Contact dermatitis**, v. 54, n. 2, p. 73-74, 2006.
- LIU, Guanghui et al. Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. **Respiratory research**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2019.
- LOMBARDO, Lynda J.; BALMES, John R. Occupational asthma: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. suppl 4, p. 697-704, 2000.
- LONG, C. et al. Design optimization of liquid-phase flow patterns for microfabricated lung on a chip. **Annals of biomedical engineering**, v. 40, n. 6, p. 1255-1267, 2012.
- LUMMUS, Zana L.; WISNEWSKI, Adam V.; BERNSTEIN, David I. Pathogenesis and disease mechanisms of occupational asthma. **Immunology and Allergy Clinics**, v. 31, n. 4, p. 699-716, 2011.
- LUNGOVA, Vlasta et al. Human induced pluripotent stem cell-derived vocal fold mucosa mimics development and responses to smoke exposure. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2019.
- LUO, Weihang et al. Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma. **Frontiers in Immunology**, p. 4598, 2022.
- MAGRO-LOPEZ, Esmeralda et al. Effects of lung and airway epithelial maturation cocktail on the structure of lung bud organoids. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2018.
- MARTIN, Thomas R.; FREVERT, Charles W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 5, p. 403-411, 2005.

- MARTINS, João D. et al. Phospholipidomic Profile Variation on THP-1 Cells Exposed to Skin or Respiratory Sensitizers and Respiratory Irritant. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 12, p. 2639-2651, 2016.
- MARX, Uwe et al. Biology-inspired microphysiological systems to advance patient benefit and animal welfare in drug development. **Altex**, v. 37, n. 3, p. 365, 2020.
- MAESTRELLI, Piero et al. Causes and phenotypes of work-related asthma. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 13, p. 4713, 2020.
- MCCRARY, Michaela W. et al. Decellularized tissues as platforms for in vitro modeling of healthy and diseased tissues. **Acta biomaterialia**, v. 111, p. 1-19, 2020.
- MCLAFFERTY, Ella et al. Respiratory system part 1: pulmonary ventilation. **Nursing Standard (through 2013)**, v. 27, n. 22, p. 40, 2013.
- MÉAUSOONE, Clémence et al. Toxicological responses of BEAS-2B cells to repeated exposures to benzene, toluene, m-xylene, and mesitylene using air-liquid interface method. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 8, p. 1262-1274, 2021.
- MECA, Olga et al. Do low molecular weight agents cause more severe asthma than high molecular weight agents?. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0156141, 2016.
- MELO, Esther et al. Development of a bronchial wall model: triple culture on a decellularized porcine trachea. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 21, n. 9, p. 909-921, 2015.
- MITJANS, Montserrat et al. Role of p38 MAPK in the selective release of IL-8 induced by chemical allergen in naive THp-1 cells. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 2, p. 386-395, 2008.
- MITJANS, M. et al. Use of IL-8 release and p38 MAPK activation in THP-1 cells to identify allergens and to assess their potency in vitro. **Toxicology in vitro**, v. 24, n. 6, p. 1803-1809, 2010.
- MITTAL, Rahul et al. Organ-on-chip models: implications in drug discovery and clinical applications. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 6, p. 8352-8380, 2019.
- MIZOGUCHI, Izuru et al. Prediction of chemical respiratory and contact sensitizers by OX40L expression in dendritic cells using a novel 3D coculture system. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 929, 2017.
- MIZUMURA, Kenji et al. Role of Nrf2 in the pathogenesis of respiratory diseases. **Respiratory investigation**, v. 58, n. 1, p. 28-35, 2020.
- MOGHADAS, Hajar et al. Challenge in particle delivery to cells in a microfluidic device. **Drug delivery and translational research**, v. 8, n. 3, p. 830-842, 2018.
- MORGAN, Edward et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical immunology**, v. 110, n. 3, p. 252-266, 2004.

MORI, Takashi et al. Comparison of cytokine profiles in bronchoalveolar lavage fluid of mice exposed to respiratory and contact sensitizers. **The Journal of toxicological sciences**, v. 37, n. 2, p. 337-343, 2012.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NADKARNI, Rohan R.; ABED, Soumeya; DRAPER, Jonathan S. Organoids as a model system for studying human lung development and disease. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 473, n. 3, p. 675-682, 2016.

NARUSE, Mie et al. An organoid-based carcinogenesis model induced by in vitro chemical treatment. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 10, p. 1444-1453, 2020.

NEUHAUS, Vanessa et al. Assessment of long-term cultivated human precision-cut lung slices as an ex vivo system for evaluation of chronic cytotoxicity and functionality. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2017.

NEWMAN, Stephen P. Drug delivery to the lungs: challenges and opportunities. **Therapeutic delivery**, v. 8, n. 8, p. 647-661, 2017.

NURBAETI, Siti N. et al. Active mediated transport of chloramphenicol and thiamphenicol in a Calu-3 lung epithelial cell model. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 107, n. 4, p. 1178-1184, 2018.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 429. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Paris, 2010.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Series on Testing and Assessment, Documento No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence, Paris, 2014.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Users' Handbook supplement to the Guidance Document for developing and assessing Adverse Outcome Pathways  
OECD, Paris, 2018.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 497. Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation, Paris, 2021.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 406. Skin Sensitisation, Paris, 2022a.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 442C. In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, Paris, 2022b.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 442D. In Vitro Skin Sensitisation ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, Paris, 2022c.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 442E. In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, Paris, 2022d.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 467. Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation, Paris, 2022e.

OGAWA, Hirohisa et al. Toluene diisocyanate (TDI) induces production of inflammatory cytokines and chemokines by bronchial epithelial cells via the epidermal growth factor receptor and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. **Experimental lung research**, v. 32, n. 6, p. 245-262, 2006.

O'NEILL, John D. et al. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. **The Annals of thoracic surgery**, v. 96, n. 3, p. 1046-1056, 2013.

PARKER, Dane; PRINCE, Alice. Innate immunity in the respiratory epithelium. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 45, n. 2, p. 189-201, 2011.

PEMBERTON, Mark A.; KIMBER, Ian. Classification of chemicals as respiratory allergens based on human data: Requirements and practical considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 123, p. 104925, 2021.

PISTOLLATO, Francesca et al. Current EU regulatory requirements for the assessment of chemicals and cosmetic products: challenges and opportunities for introducing new approach methodologies. **Archives of toxicology**, v. 95, n. 6, p. 1867-1897, 2021.

PIQUÉ, Núria; DE SERVI, Barbara. Rhinosectan® spray (containing xyloglucan) on the ciliary function of the nasal respiratory epithelium; results of an in vitro study. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2018.

PONTREMOLI, Carlotta et al. Mucin–drugs interaction: the case of theophylline, prednisolone and cephalexin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 20, p. 6581-6586, 2015.

POTTER, David W.; WEDERBRAND, Karen S. Total IgE antibody production in BALB/c mice after dermal exposure to chemicals. **Toxicological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 127-135, 1995.

RAYNER, Rachael E. et al. Optimization of normal human bronchial epithelial (NHBE) cell 3D cultures for in vitro lung model studies. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

REMY, Sylvie et al. Gene expressions changes in bronchial epithelial cells: markers for respiratory sensitizers and exploration of the NRF2 pathway. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 2, p. 209-217, 2014.

- RIEG, Annette D. et al. Tyrosine kinase inhibitors relax pulmonary arteries in human and murine precision-cut lung slices. **Respiratory Research**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2019.
- ROMAGNANI, Sergio. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 395-400, 2004.
- SAKAGUCHI, Hitoshi et al. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test–human cell line activation test (h-CLAT). **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 2, p. 109-126, 2009.
- SEED, M. J.; ENOCH, S. J.; AGIUS, R. M. Chemical determinants of occupational hypersensitivity pneumonitis. **Occupational Medicine**, v. 65, n. 8, p. 673-681, 2015.
- SHAMI, Suzan G; EVANS, Michael J. Appendix 2 - Kinetics of Pulmonary Cells. In: PARENT, Richard A. (Ed.). **Comparative biology of the normal lung**. Academic Press, 2015.
- SCHAGEN, Johanna; SLY, Peter D.; FANTINO, Emmanuelle. Characterizing well-differentiated culture of primary human nasal epithelial cells for use in wound healing assays. **Laboratory Investigation**, v. 98, n. 11, p. 1478-1486, 2018.
- SHRESTHA, Jesus et al. A rapidly prototyped lung-on-a-chip model using 3D-printed molds. **Organs-on-a-Chip**, v. 1, p. 100001, 2019.
- SIA, Samuel K.; WHITESIDES, George M. Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. **Electrophoresis**, v. 24, n. 21, p. 3563-3576, 2003.
- SIBINOVSKA, Nadica; ŽAKELJ, Simon; KRISTAN, Katja. Suitability of RPMI 2650 cell models for nasal drug permeability prediction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 145, p. 85-95, 2019.
- SINGH, Mona et al. Gene regulation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1): A molecule with multiple functions. **Immunology letters**, v. 240, p. 123-136, 2021.
- SPINU, Nicoleta et al. Quantitative adverse outcome pathway (qAOP) models for toxicity prediction. **Archives of toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1497-1510, 2020.
- STUCKI, Andreas O. et al. A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 5, p. 1302-1310, 2015.
- STURTON, Richard G. et al. Pharmacological characterization of indacaterol, a novel once daily inhaled  $\beta_2$  adrenoceptor agonist, on small airways in human and rat precision-cut lung slices. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 1, p. 270-275, 2008.
- SUCRE, Jennifer MS et al. A three-dimensional human model of the fibroblast activation that accompanies bronchopulmonary dysplasia identifies Notch-mediated pathophysiology. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 310, n. 10, p. L889-L898, 2016.

STRIKOUDIS, Alexandros et al. Modeling of fibrotic lung disease using 3D organoids derived from human pluripotent stem cells. **Cell reports**, v. 27, n. 12, p. 3709-3723. e5, 2019.

SULLIVAN, Kristie M. et al. An adverse outcome pathway for sensitization of the respiratory tract by low-molecular-weight chemicals: Building evidence to support the utility of in vitro and in silico methods in a regulatory context. *Applied In Vitro Toxicology*, v. 3, n. 3, p. 213-226, 2017.

TAN, Qi et al. Nascent lung organoids reveal epithelium-and bone morphogenetic protein-mediated suppression of fibroblast activation. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 61, n. 5, p. 607-619, 2019.

TEMANN, Angela et al. Evaluation of inflammatory and immune responses in long-term cultured human precision-cut lung slices. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 2, p. 351-358, 2017.

TIAN, Guoxiong et al. Indirect effect of PM1 on endothelial cells via inducing the release of respiratory inflammatory cytokines. **Toxicology in Vitro**, v. 57, p. 203-210, 2019.

TOLLSTADIUS, Bruna Ferreira et al. Carbendazim induces death in alveolar epithelial cells: A comparison between submerged and at the air-liquid interface cell culture. **Toxicology In Vitro**, v. 58, p. 78-85, 2019.

TRIANAFILLOU, Vasiliki et al. Broncho-Vaxom®(OM-85 BV) soluble components stimulate sinonasal innate immunity. In: **International forum of allergy & rhinology**. 2019. p. 370-377.

UPADHYAY, Swapna; PALMBERG, Lena. Air-liquid interface: relevant in vitro models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 164, n. 1, p. 21-30, 2018.

US NRC, The National Academy of Sciences. Toxicity Testing in the 21<sup>st</sup> Century: A Vision and a Strategy, Washington, 2007.

VAN DER VELDEN, Jos L. et al. TGF- $\beta$ 1-induced deposition of provisional extracellular matrix by tracheal basal cells promotes epithelial-to-mesenchymal transition in a c-Jun NH2-terminal kinase-1-dependent manner. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 314, n. 6, p. L984-L997, 2018.

VAN DER ZALM, Anna J. et al. A framework for establishing scientific confidence in new approach methodologies. **Archives of Toxicology**, p. 1-15, 2022.

VAN OCH, François MM et al. Cytokine production induced by low-molecular-weight chemicals as a function of the stimulation index in a modified local lymph node assay: an approach to discriminate contact sensitizers from respiratory sensitizers. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 184, n. 1, p. 46-56, 2002.

VERSTRAELEN, Sandra et al. Gene profiles of a human bronchial epithelial cell line after in vitro exposure to respiratory (non-) sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. **Toxicology**, v. 255, n. 3, p. 151-159, 2009.

WAGNER, Darcy E. et al. Comparative decellularization and recellularization of normal versus emphysematous human lungs. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3281-3297, 2014.

WHITESIDES, George M. et al. Flexible methods for microfluidics. **Phys. Today**, v. 54, n. 6, p. 42-48, 2001.

XIONG, G. et al. Development of an ex vivo breast cancer lung colonization model utilizing a decellularized lung matrix. **Integrative Biology**, v. 7, n. 12, p. 1518-1525, 2015.

XU, Liangtao et al. Cigarette smoke triggers inflammation mediated by autophagy in BEAS-2B cells. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 184, p. 109617, 2019.

YAN, Chenzhi et al. In vitro and in vitro toxicity study of diesel exhaust particles using BEAS-2B cell line and the nematode *Caenorhabditis elegans* as biological models. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 43, p. 60704-60716, 2021.

YANG, Xingyuan et al. Nanofiber membrane supported lung-on-a-chip microdevice for anti-cancer drug testing. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 3, p. 486-495, 2018.

YILMAZ, Yildiz et al. Comparison of rat and human pulmonary metabolism using precision-cut lung slices (PCLS). **Drug Metabolism Letters**, v. 13, n. 1, p. 53-63, 2019.

ZELLER, Kathrin S. et al. An alternative biomarker-based approach for the prediction of proteins known to sensitize the respiratory tract. **Toxicology in Vitro**, v. 46, p. 155-162, 2018.

### 7.1 - Anexo 1: Lista de publicações obtidas durante o período de doutorado

DA PENHA, Jaqueline Rodrigues et al. Development of a novel ex vivo model for chemical ocular toxicity assessment and its applicability for hair straightening products. **Food and Chemical Toxicology**, p. 113457, 2022.

STIVAL, Larissa R. et al. Correlation of hair cortisol and interleukin 6 with structural change in the active progression of keratoconus. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 48, n. 5, p. 591-598, 2022.

HAYASAKI, Tatyane Gonçalves et al. Ex vivo pulmonary assay applied for screening of toxicity potential of chemicals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 161, p. 112820, 2022.

CINTRA, Emílio R. et al. Folate-Targeted PEGylated Magnetoliposomes for Hyperthermia-Mediated Controlled Release of Doxorubicin. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 854430-854430, 2022.

ARANTES, Diego Antonio Costa et al. Biological effects of formulation containing curcuminoids and Bidens Pilosa L. in oral carcinoma cell line. **Brazilian Oral Research**, v. 35, 2021.

OLIVEIRA, Leandra de Almeida Ribeiro et al. The potential of vouacapanes from Pterodon emarginatus Vogel against COVID-19 cytokine storm.

ARANTES, Diego Antônio Costa et al. Safety and efficacy of a mucoadhesive phytomedication containing curcuminoids and Bidens pilosa L. extract in the prevention and treatment of radiochemotherapy-induced oral mucositis: Triple-blind, randomized, placebo-controlled, clinical trial. **Head & Neck**, v. 43, n. 12, p. 3922-3934, 2021.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, Higor et al. Small-molecule MDM2 inhibitor LQFM030-induced apoptosis in p53-null K562 chronic myeloid leukemia cells. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 4, p. 444-457, 2020.

ANDRADE, Wanessa Machado et al. Innovative strategy based on mechanisms to substitute animal testing for ocular toxicity assessment of agrochemical formulations market in Brazil. **Toxicology in Vitro**, v. 66, p. 104851, 2020.

DA SILVA, Artur Christian Garcia et al. Antiangiogenic and antitumoral activity of LQFM126 prototype against B16F10 melanoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 325, p. 109127, 2020.

GALVAO, Gustavo M. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity profile of a new lead compound–LQFM219. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106893, 2020.

BEZERRA, Soraia F. et al. Application of the adverse outcome pathway framework for investigating skin sensitization potential of nanomaterials using new approach methods. **Contact Dermatitis**, v. 84, n. 2, p. 67-74, 2021.

DA SILVA, Artur Christian Garcia et al. Assessing Agricultural Toxicity in Brazil: Advances and Opportunities in the 21st Century. **Toxicological Sciences**, v. 177, n. 2, p. 316-324, 2020.

DA SILVA, Artur CG et al. A new corneal epithelial biomimetic 3D model for in vitro eye toxicity assessment: Development, characterization and applicability. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104666, 2020.

DE OLIVEIRA JUNIOR, Edilson Ribeiro et al. Increased nose-to-brain delivery of melatonin mediated by polycaprolactone nanoparticles for the treatment of glioblastoma. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 9, p. 1-10, 2019.

PACHECO, Maiulle T. et al. Protective effect of sucupira oil nanoemulsion against oxidative stress in UVA-irradiated HaCaT cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1532-1543, 2019.

ANDRADE, Wanessa Machado; DA SILVA, Artur Christian Garcia; VALADARES, Marize Campos. Corneal histomorphometric analysis: The depth of damage induced in the bovine cornea correlates with the severity of the ocular toxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 61, p. 104593, 2019.

TOLLSTADIUS, Bruna Ferreira et al. Carbendazim induces death in alveolar epithelial cells: A comparison between submerged and at the air-liquid interface cell culture. **Toxicology In Vitro**, v. 58, p. 78-85, 2019.

DOS SANTOS FILHO, Edvande Xavier et al. Chemopreventive effects of FITOPROT against 5-fluorouracil-induced toxicity in HaCaT cells. **Life sciences**, v. 193, p. 300-308, 2018.

DA SILVA, Artur Christian Garcia et al. Mechanistic-based non-animal assessment of eye toxicity: Inflammatory profile of human keratinocytes cells after exposure to eye damage/irritant agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 292, p. 1-8, 2018.

DOS SANTOS, Thaís Rosa Marques et al. Toxicopharmacological evaluations of the small-molecule LQFM166: Inducer of apoptosis and MDM2 antagonist. **Chemico-Biological Interactions**, v. 293, p. 20-27, 2018.