



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Rodrigo Berguio Vidotti

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE BIOMATERIAIS E VESÍCULAS CELULARES NA
REPARAÇÃO TECIDUAL EM MODELO DE DERMATITE ATÓPICA EM RATOS**

São José Do Rio Preto

2022

Rodrigo Berguio Vidotti

Efeito da associação de biomateriais e vesículas celulares na reparação tecidual
em modelo de dermatite atópica em ratos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, área de concentração em Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES DS (88887.583725/2020-00)

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Girol

São José do Rio Preto

2022

V654e Vidotti, Rodrigo Berguio

Efeito da associação de biomateriais e vesículas celulares na
reparação tecidual em modelo de dermatite atópica em ratos / Rodrigo
Berguio Vidotti. -- São José do Rio Preto, 2022
55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientadora: Ana Paula Girol

1. Dermatite atópica. 2. Inflamação Mediadores. 3. Células-Tronco.
4. Materiais biomédicos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Rodrigo Berguio Vidotti

Efeito da associação de biomateriais e vesículas celulares na reparação tecidual
em modelo de dermatite atópica em ratos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, área de concentração em Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES DS (88887.583725/2020-00)

Comissão Examinadora

Profa. Dra Ana Paula Girol
UNIFIPA - Catanduva – Orientadora

Profa. Dra Cristiane Damas Gil
UNIFESP – São Paulo

Prof. Dr. Andréia de Haro Moreno
UNIFIPA – Catanduva

São José do Rio Preto

09 de dezembro de 2022

Dedico este trabalho

A minha esposa Giovana e ao meu maior presente neste Mestrado, minha filha Maria Luiza, a minha Zizi, meu norte, minha motivação para seguir em frente, “meu coração na mão”.

À minha orientadora, Profª Drª Ana Paula Girol, meu respeito e reconhecimento pela competência e preciosismo profissional. Além da fundamental importância na minha formação, foi essencial para a finalização deste trabalho, com paciência, amizade e empatia. Agradeço imensamente pelo aceite como seu aluno e por toda ajuda neste momento importante e difícil.

AGRADECIMENTOS

Há algumas oportunidades na vida científica para aprendermos que a execução de ideias depende de trabalho em equipe:

À Deus, por estar sempre ao meu lado orientando, dando força e fortalecendo a minha fé. A ele, agradecimentos eternos por tudo que consegui em vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento DS (88887.583725/2020-00).

À Profª Dra. Lilian Madi Ravazzi, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), e aos demais professores do programa.

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), e a todos os funcionários pela atenção e colaboração, em especial ao Erick Cursino Vivan, sempre disposto a responder minhas questões rapidamente.

Ao Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) pelo uso de suas dependências, o Unidade Didática e de Pesquisa Experimental, Laboratório de Histopatologia, Imuno-histoquímica e Laboratório Multidisciplinar.

Às técnicas e amigas do laboratório, Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon e Ariane Yoshikawa, aos colegas do biotério, Sr. Edgar, Juarez e Christiane que me auxiliaram com todo carinho, alegria e disposição neste trabalho. E ao Dr. Lucas Possebon e ao Dr. Daniel Navarro, pelas contribuições no exame de qualificação e ajuda na realização experimentos e preparo do biomaterial.

Há oportunidades em que além do trabalho em equipe, existem alguns e privilegiados casos, onde acontece a amizade:

A querida amiga Moniele Sant'Ana, por quem tenho carinho especial, pelo apoio e incentivo constante e ajuda nos experimentos nesses momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. José Ricardo Muniz Ferreira, presidente da RCrio Criogenia – Campinas-SP, excelente profissional, cuja colaboração foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho cedendo o uso de seus biomateriais e também por todas as discussões científicas.

Ao querido amigo Daniel Henrique Gonçalves, pelo apoio, incentivo, e conversas sobre a vida, pós-graduação e nosso papel nesse mundo louco!

Também há outras oportunidades para aprendermos o significado do coleguismo:

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração deste trabalho no qual dificilmente poderiam ser devidamente citadas, sem que se cometesse a injustiça do esquecimento, meu agradecimento.



Homenagem ao Rato de laboratório - Andrew Kharkevitch, 2013, Instituto de Citologia e Genética de Novosibirsk, Sibéria.

“Aos ratos, que na doação da vida, tornaram-me possível o título de Mestre”.

RESUMO

Introdução: No campo da dermatologia e alergologia veterinária, a dermatite atópica (DA) é a dermatopatia alérgica mais prevalente em cães e novas terapias são necessárias. Nesse sentido, biomateriais e vesículas extracelulares (VE) de células-tronco mesenquimais são interessantes, pois influenciam na regeneração tecidual. **Objetivos:** avaliar o processo de cicatrização da pele de ratos induzidos à manifestação da DA e tratados com biomaterial composto de hidroxiapatita e quitosana associado ou não a VE derivadas de células-tronco provenientes da polpa de dente de leite. **Métodos:** Para indução da DA, uma área raspada do dorso de ratos foi exposta a acetona aplicada com algodão e friccionada por 5 min, sob sedação profunda, por 3 dias. No dia 3, aproximadamente 1 h após a última aplicação, a fisiologia da pele e a ação de coçar foram avaliadas. Os tratamentos começaram no dia 3 e duraram 5 dias. Os grupos experimentais (n=5/grupo) foram: induzido sem tratamento (DA), tratado com pomada de hidrocortisona (TH) a 10% (tratamento padrão, 1x/dia), tratado com biomaterial sem VE (TB) ou com VE (TBVE), em aplicação única como curativos. Aos 8 dias pós-indução, os animais foram eutanasiados e o sangue e fragmentos de pele foram coletados. O processo de cicatrização da pele foi avaliado clinicamente por meio de estudo histopatológico, análises de mastócitos e da expressão de anexina A1 (AnxA1) e de células imunomarcadas para Janus quinase (JAK 1 e JAK-3). Histamina, interleucinas (IL1- β , IL-6, IL-10 e IL-31), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fatores de crescimento epidérmico (EGF) e vascular endotelial (VEGF) foram dosados no plasma e/ou sobrenadante do macerado de pele. **Resultados:** As lesões de pele não tratadas (DA) apresentaram ruptura e hiperplasia da epiderme e influxo inflamatório. Os animais do grupo TH, embora com regiões cutâneas regeneradas, ainda apresentavam áreas com epiderme rompida e infiltrado inflamatório. Em contrapartida, os animais dos grupos TB e TBVE mostraram melhor processo de regeneração. O grupo DA apresentou maior número de mastócitos, principalmente degranulados. Todos os tratamentos promoveram redução de mastócitos, especialmente dos degranulados (TH, $p<0,05$; TB, $p<0,01$; TBVE, $p<0,001$). Os níveis de histamina plasmática foram reduzidos no grupo TBVE ($p<0,05$). A expressão da AnxA1 foi elevada nos grupos DA e TH e diminuída nos grupos tratados com biomateriais, especialmente TBVE. Da mesma forma, as células positivas para JAK-1 e JAK-3 e a expressão de JAK-1 na epiderme foram reduzidas pelos tratamentos com biomateriais. Além disso, esses tratamentos reduziram os níveis de TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-31 e VEGF. **Conclusões:** Tratamentos com biomateriais, principalmente associados a VE, reduziram o processo inflamatório e estimularam a regeneração tecidual na DA, com importante perspectiva de aplicação terapêutica.

Palavras-chave: Cicatrização cutânea. Mediadores inflamatórios. Polpa de dente de leite. Células-tronco mesenquimais. Hidroxiapatita. Quitosana.

ABSTRACT

Introduction: In the field of veterinary dermatology and allergology, atopic dermatitis (AD) is the most prevalent allergic skin disease in dogs and new therapies are needed. In this sense, biomaterials and extracellular vesicles (EV) from mesenchymal stem cells are interesting as they influence tissue regeneration. **Objectives:** to evaluate the skin healing process of rats induced to manifest AD and treated with a biomaterial composed of hydroxyapatite and chitosan associated or not with EV from stem cells derived from milk-tooth pulp. **Methods:** To induce AD, a shaved area of the back of the rats was exposed to acetone applied with cotton and rubbed for 5 min, under deep sedation, for 3 days. On day 3, approximately 1 h after the last application, skin physiology and scratching action were assessed. Treatments started from day 3 and lasted 5 days. Experimental groups (n=5/group) were: induced without treatment (AD), treated with 10% hydrocortisone ointment (TH) (standard treatment, 1x/day), treated with biomaterial without EV (TB) or with EV (TBEV). At 8 days post-induction, the animals were euthanized and blood and skin fragments were collected. The skin healing process was clinically evaluated through histopathological analysis, mast cell evaluation, annexin A1 (AnxA1) and Janus kinase (JAK 1 and JAK-3) expressions. Histamine, interleukins (IL1- β , IL-6, IL-10), tumor necrosis factor (TNF- α) and epidermal and vascular endothelial growth factors (EGF and VEGF) were measured in the plasma and/or skin macerate supernatant. **Results:** Untreated skin lesions (AD) showed rupture and hyperplasia of the epidermis and inflammatory influx. The animals in the TH group, although with regenerated skin regions, still presented areas with ruptured epidermis, with inflammatory infiltrate. In contrast, the animals in the TB and TBEV groups showed a better recovery process. The AD group had the highest number of mast cells, mainly degranulated. All treatments promoted the reduction of mast cells, especially degranulated (TH, $p<0.05$; TB, $p<0.01$; TBVE, $p<0.001$). Plasma histamine levels were reduced in the TBEV group. ($p<0.05$). AnxA1 expression was elevated in AD and TH groups and decreased in groups treated with biomaterials, especially TBVE. Similarly, JAK-1 and JAK-3 positive cells and the expression of JAK-1 in the epidermis were reduced by biomaterials treatments. Furthermore, these treatments reduced the levels of TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-31 and VEGF. **Conclusions:** Treatments with biomaterials, mainly associated with EV, reduced the inflammatory process and stimulated tissue regeneration in AD, with important perspective for therapeutic application.

Keywords: Skin healing. Inflammatory mediators. Milk-tooth pulp. Mesenchymal stem cells. Hydroxyapatite. Chitosan.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. O desenvolvimento clínico da doença na DA canina	16
Figura 2. Mecanismos imunológicos da DA canina	18
Figura 3. Modelo esquemático da modulação da inflamação no modelo de DA e tratamentos com biomateriais.....	49

Manuscrito

Figura 1. Aplicação do biomaterial.....	32
Figura 2. Indução da Dermatite Atópica (DA)	35
Figura 3. Análises mscroscópicas e histológicas das lesões de DA e tratamentos	36
Figura 4. Análises dos mastócitos e histamaina no modelo de DA e tratamentos.....	37
Figura 5. Expressão endógena da AnxA1 no modelo de DA e tratamentos.....	38
Figura 6. Imunomarcção para JAK-1 e JAK-3 no modelo de DA e tratamentos	39
Figura 7. Dosagem das citocinas e fatores de crescimento no plasma e macerado.	40
Figura 8. Análise da expressão de IL-31 no macerado.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Anexina A1
BSA	Albumina bovina
CA	<i>Centella asiática</i>
CD105	<i>Cluster of Differentiation</i> 105
CD14	<i>Cluster of Differentiation</i> 14
CD166	<i>Cluster of Differentiation</i> 166
CD31	<i>Cluster of Differentiation</i> 31
CD34	<i>Cluster of Differentiation</i> 34
CD45	<i>Cluster of Differentiation</i> 45
CD73	<i>Cluster of Differentiation</i> 73
CD90	<i>Cluster of Differentiation</i> 90
cm	centímetro
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTM	Células tronco mesenquimais
D.O.M	Densidade óptica média
DA	Dermatite atópica
DAB	Diaminobenzina
EGF	Fator de crescimento endotelial
EGFR	Receptor do Fator de crescimento endotelial
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
h	hora
HaCat	Linhagem de queratinócitos imortalizados
HE	Hematoxilina Eosina
HLA-DR	Sistema de histocompatibilidade humano-DR
RNA	Ácido ribonucleico
IFN	interferon
IgE	Imunoglobulina-E
IgG	Imunoglobulina-G
IL-10	Interleucina-10
IL-17A	Interleucina-17A
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-31	Interleucina-31
IL-33	Inerleucina-33
IL-34	Inerleucina-34

IL-6	Interleucina-6
IL-9	Interleucina-9
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
JAK1	Janus Kinase 1
JAK2	Janus Kinase 2
JAK3	Janus Kinase 3
lncRNA	ácido ribonucleico não codificantes longos
MCd	Mastócito desgranulado
MCi	Mastócito intacto
MCs	Mastócitos
min	minuto
miRNA	micro-ácido ribonucleico
mm ²	Milímetros quadrados
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
n	Número de amostra
ncRNA	ácido ribonucleico não codificantes
°C	Graus Celsius
OVA	ovoalbumina
p	Valor de p (significância do teste estatístico)
PIGF-1	Fator de crescimento placentário
RPM	rotações por minuto
STAT	transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição
TARC	Timo quimiocina regulada por ativação
TB	Animais tratados com biomaterial sem VE
TBVE	Animais tratados com biomaterial com VE
TH	Animais tratados com pomada de hidrocortisona a 10%
Th2	linfócitos T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSLP	linfopoitina estromal tímica
TYK2	Tirosina quinase 2
UDPE	Unidade Didática e Pesquisa Experimental
UNIFIPA	Centro Universitário Padre Albino
VE	Vesículas Extracelulares
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
vs.	Versus
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	23
2.1.Objetivos Gerais	23
2.2.Objetivos Específicos	23
3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	24
Efeito da associação de biomateriais e vesículas celulares na reparação tecidual em modelo de dermatite atópica em ratos.....	25
4. CONCLUSÕES	48
5. REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO –aprovação CEUA	

1. INTRODUÇÃO

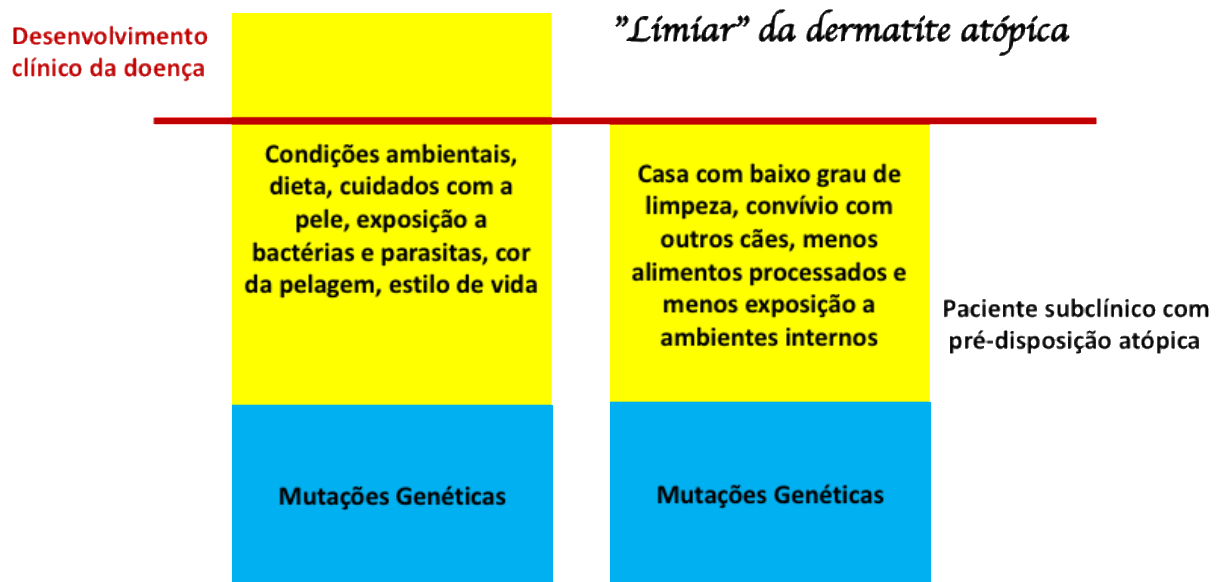
1.1 Dermatite Atópica (DA)

A dermatite atópica em cães é uma doença alérgica da pele com uma prevalência de 10 a 15% e tem muitas semelhanças com a DA humana (COSGROVE et al., 2015; PUCHEU-HASTON, 2016). Embora a causa da DA canina não seja clara, sabe-se que há alteração da barreira cutânea e da resposta imunológica como resultado de interações complexas, como fatores genéticos (mutação da filagrina), fatores ambientais (alérgenos) e desequilíbrio da função imunológica (PUCHEU-HASTON, 2016; JASSIES-VAN DER LEE, 2014; SCHOTTER et al., 2011; ROESNER et al., 2016).

O entendimento quanto a DA canina aumentou na última década, juntamente com os avanços da própria ciência veterinária. Com a mudança dos animais de estimação para dentro das residências, sendo considerado mais um ente da família, a DA também sofreu mudanças quanto ao aspecto clínico, sendo resultado de intensas interações entre fatores ambientais e genéticos (FLOHR, 2011; MARSELLA, 2021). Muitos fatores além de histamina, mastócitos e IgE, são já conhecidos no desenvolvimento da doença (PUCHEU-HASTON, 2016). Outros estudos se concentraram no papel da barreira cutânea tanto em termos de alterações ultraestruturais e disbiose (WHITE et al., 2018) quanto no papel de várias populações linfocíticas (VAN DER LEE et al., 2014; SARIDOMICHELAKIS, 2016). A apresentação do prurido na DA pode ser sazonal, dependendo do tipo de alérgeno envolvido e pode ser tanto localizada quanto generalizada (OLIVRY et al. 2010).

Enquanto os animais de estimação no passado estavam mais expostos a um ambiente ao ar livre com menos ingestão de alimentos processados em vez de dietas cruas, uma maior exposição a ambientes internos e ácaros da poeira doméstica, e uma menor exposição a bactérias benéficas podem contribuir a um aumento do desenvolvimento de sinais clínicos de DA (Figura 1) (MARSELLA, 2021). Com os fatores genéticos sendo considerados uma constante, as mudanças na condição do ambiente podem por si só, determinar um aumento do desenvolvimento da doença clínica. Essa linha de pensamento é descrita por alguns autores na literatura veterinária que determinam uma estreita ligação entre hábitos alimentares, estilo e condições de vida no desenvolvimento da DA. De interesse, a cor da pelagem tem sido associada ao desenvolvimento de DA e ter mais de 50% da cor da pelagem branca foi relatado como um fator de risco (CZARNOWICKI, 2019; RODUIT, 2017).

Figura 1. O desenvolvimento da doença clínica na DA canina. Resultado de fatores genéticos e ambientais. A diminuição da exposição a bactérias benéficas e o aumento da exposição a alérgenos internos e alimentos processados são alguns dos fatores de risco relatados em cães. Fonte. Adaptado de Marsella, 2021.



A DA canina comumente acomete animais entre 6 meses e 6 anos de idade. As regiões características são espaços interdigitais, região periocular, virilha e axilas, pavilhões auriculares e muitas vezes a face também é afetada (RHODES, 2014; LITTLE et al., 2015). Os sinais clínicos mais evidentes são traumatismo autoinduzido devido a prurido, hiperqueratose, hipotricose, eritema, hiperpigmentação, crostas, infecções bacterianas e fúngicas secundárias e em alguns casos, alopecia. Em casos ainda mais específicos, pode-se encontrar conjuntivite com blefarite secundária, e em cadelas, baixa fertilidade e incidência de pseudociese (HNILICA, 2012; RHODES, 2014).

1.2 Barreira cutânea e DA

A via epicutânea de exposição é importante tanto para a sensibilização (MARSELLA, 2015; MARSELLA, 2006) quanto para eliciação de sinais clínicos (OLIVRY, 2010; OLIVRY, 2017; COBIELLA, 2019). Sabe-se que há um dano secundário da barreira cutânea em cães atópicos devido a inflamação e ao autotraumatismo. Consequentemente, há um maior desenvolvimento de resposta a alérgenos (PRÉLAUD, 2010).

Enquanto que nos seres humanos a pele atópica é mais seca quando comparada a pele

normal, em cães atópicos, a pele apresenta-se com aspecto normal, já que é mais alcalina. Isso pode estar relacionado ao fato de cães atópicos terem uma expressão gênica aumentada de proteínas como a filagrina (DRISLANE, 2020; CABANILLAS, 2016), cujos produtos de degradação (fatores hidratantes naturais) são importantes para a hidratação. Mutações no gene da filagrina têm sido relatadas como um dos fatores de risco mais documentados para dermatite em pessoas (COMBARROS, 2020); assim, era natural abordar esta questão em cães. KVAC (2021) identificaram mais de uma proteína do tipo filagrina em cães expressas em camadas superiores da pele, responsáveis pela diferenciação da epiderme.

Alguns estudos foram publicados enfatizando a genética e incidência de DA canina, porém tiveram números amostrais pequenos, resultando em prejuízo na detecção de novos fatores e variação de raças (PROKSCH, 2018). Segundo DEBOER (2010), a atividade proteolítica aumentada é resultante da acidificação da pele atópica e parece ser tentativa de compensação do insulto, detectando assim, aumento de filagrina em modelos experimentais de dermatite.

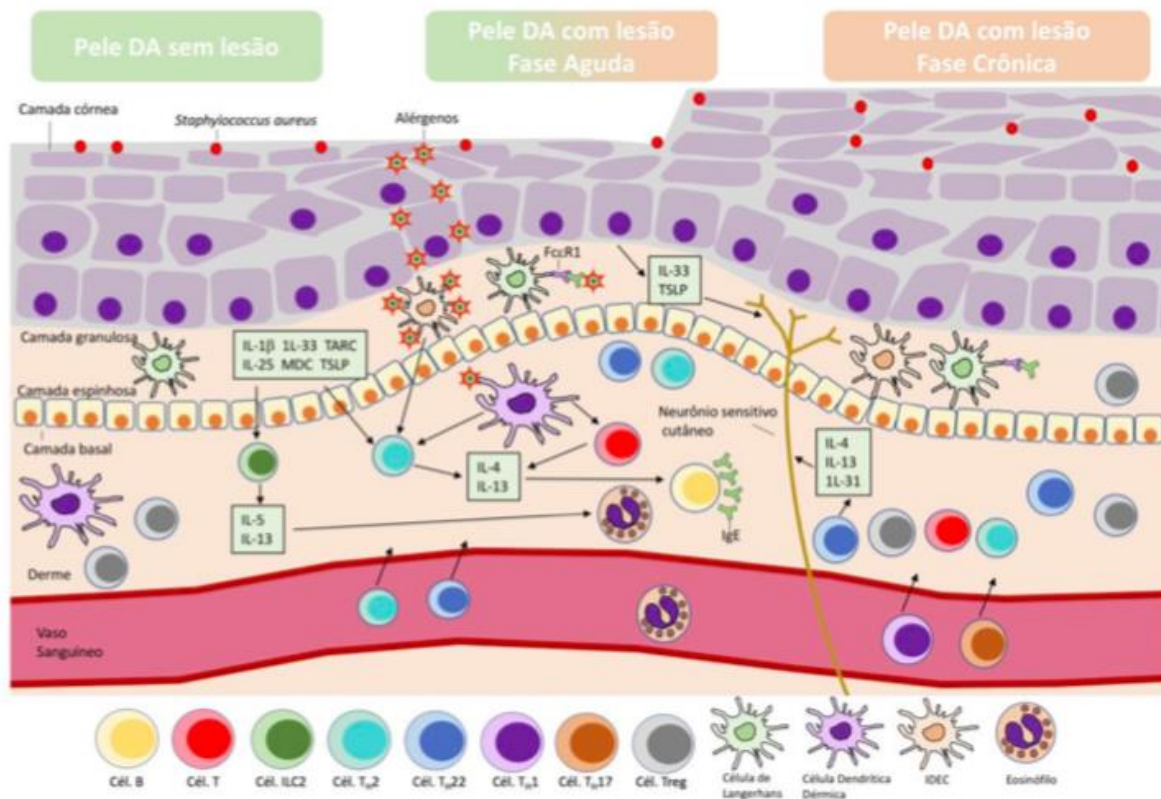
1.3 Fisiopatologia e Patogênese da DA

Alguns mecanismos que são envolvidos na patologia da DA canina foram citados por DEBOER (2010). Entre os mais importantes estão modificação na barreira epidérmica, o que permite uma maior permeabilidade da pele, consequentemente, facilitando entrada de alérgenos; a diminuição da produção de peptídeos antimicrobianos, o que facilita a incidência de infecções cutâneas e aumento da resposta inflamatória.

Há uma grande complexidade quando se refere a rede de citocinas atuantes em processos de alergia e prurido. A Interleucina-31 (IL-31) é secretada pelos linfócitos T helper do tipo 2 (Th2) e seu mecanismo está relacionado com a ligação de um receptor que desencadeia a via Janus quinase (JAK) transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição (STAT) (JAK/STAT). Consequentemente, gera uma resposta do sistema nervoso criando assim um ciclo vicioso envolvendo a interação neuroimune e o prurido, chamando assim de “ciclo de coceira” (CALSAVARA et al., 2017; NUTTAL, 2013). Muitos genes relacionados a sinalização de citocinas foram considerados como candidatos para DA canina (RUTKOWSKI et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2: Mecanismos imunológicos da DA canina. Ilustração esquemática das principais alterações observadas na fisiopatogenia da dermatite atópica, com foco nas alterações imunológicas.

Fonte: Adaptada de Weidinger et al., 2018.



Cél: células; Th: célula T auxiliadora; ILC: célula linfóide inata; Treg: célula T reguladora; IDEC: célula dendrítica epidérmica inflamatória.

A via de sinalização JAK- STAT é um dos componentes-chave na patogênese de várias condições imunomediadas, incluindo artrite reumatoide, artrite psoriática, doença inflamatória intestinal e dermatite atópica (DA). Várias citocinas pró-inflamatórias são capazes de exercer sua função fisiopatológica por meio da via JAK- STAT. A família JAK é composta por JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina quinase 2 (TYK2). Os inibidores de JAK têm como alvo as várias quinases, causando uma supressão na atividade de um ou mais desses alvos. Um crescente corpo de literatura demonstrou que os inibidores de JAK são seguros e eficazes em várias condições inflamatórias da pele, estendendo a investigação de inibidores de JAK como tratamento para DA (NEZAMOLAMA et al., 2020).

A via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é crucial no desenvolvimento e homeostase da pele. A família EGF compreende múltiplos mediadores, incluindo fator de crescimento transformador- α , anfirregulina, EGF de ligação à heparina e

epirregulina, todos os quais regulam a biologia dos queratinócitos. Estudos recentes mostraram a importância do EGF como um potencial alvo terapêutico para manter a saúde do epitélio intestinal e induzir a recuperação do epitélio danificado. Além disso, descobriu-se que os ligantes de EGFR são regulados positivamente em distúrbios inflamatórios crônicos da pele, como psoríase, dermatite atópica e dermatite alérgica de contato (KIM et al., 2022).

O EGF facilita a regeneração das células epidérmicas e desempenha um papel essencial no processo de cicatrização de feridas dérmicas, estimulando a proliferação e migração de queratinócitos. O tratamento com EGF pode estabilizar a degranulação de mastócitos, reduzindo assim a liberação de produtos granulares nas lesões da mucosa gástrica de ratos. Ainda, a produção de IL-17A e a expressão de IL-6 e IL-1 β na pele com DA induzida por alérgenos foram atenuadas pelo tratamento com EGF. No entanto, os efeitos clínicos e os mecanismos do EGF não foram totalmente elucidados (KIM et al., 2022).

Todas as alterações na pele da DA requerem angiogênese. Os níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no soro e na pele estão elevados em pacientes com DA em comparação aos controles; os aumentos se correlacionam com a gravidade da DA. Os níveis de VEGF são extraordinariamente regulados no estrato córneo da pele lesionada (em comparação com a pele não lesionada) de pacientes com DA. Além disso, foi relatada uma associação entre polimorfismos do gene VEGF/VEGFR e DA. A inflamação da pele na DA parece estar ligada a alterações vasculares. Mastócitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos são as principais fontes de fatores angiogênicos e linfangiogênicos. Os mastócitos de lesões de DA estimulam a angiogênese pela liberação de fatores pró-angiogênicos, incluindo VEGF-A e VEGF-B. Curiosamente, níveis aumentados dos conhecidos fatores angiogênicos como a prostaglandina E2 e adenosina na DA induzem a expressão de VEGF-A e VEGF-B em mastócitos humanos. Tais células servem como alvos para fatores angiogênicos; as células expressam VEGFR-1 e VEGFR-2. A secreção de VEGF pelos mastócitos é aumentada pelo par de receptores IL-9/IL-9, cujo nível é elevado na DA (LEE, et al., 2021).

Um mediador anti-inflamatório ainda pouco investigado na DA é a anexina A1 (AnxA1), proteína capaz de mimetizar a ação anti-inflamatória dos glicocorticóides por meio da inibição da síntese de eicosanóides e da fosfolipase A2 (PLA2) (GOBBETTI e COORAY, 2016). Na dermatite atópica (DA) induzida por ovalbumina em camundongos nocautes para AnxA1, a ausência da proteína aumentou a IgE e ativação dos mastócitos demonstrando exacerbação da resposta alérgica (PARISI et al., 2019).

1.4 Tratamentos

Os tratamentos atuais de DA canina são baseados em drogas imunomoduladoras, mas alguns dos cães têm limitações que não respondem ao tratamento padrão ou recaem após um período de tempo (COSGROVE et al., 2015; PUCHEU-HASTON, 2016; JASSIES-VAN DER LEE, 2014; SCHOTTER et al., 2011; ROESNER et al., 2016; DING et al., 2016). Além disso, o uso a longo prazo de anti-histamínicos e esteroides resulta em efeitos colaterais graves, juntamente com o aumento da resistência aos medicamentos.

No passado, os anti-histamínicos eram amplamente defendidos para o tratamento e prevenção de crises. Atualmente, a ênfase no uso de anti-histamínicos diminuiu, pois estudos controlados falharam em mostrar o efeito benéfico dos anti-histamínicos de forma duplo-cega, controlada por placebo (HSIAO et al., 2016). Atualmente há uma nova abordagem, utilizando-se dos anti-histamínicos como adjuvante na restauração da barreira epidérmica com associação a emulsões de esfingolipídeos e ácidos (BLASKOVIC, 2014; JEFFERS, 2013). O tratamento tópico também tem como objetivo prevenir e tratar infecções bacterianas (HENSEL et al., 2015), atualmente indicado em forma de monoterapia para diminuir o uso de antibióticos sistêmicos.

Alguns estudos têm se concentrado na identificação de novos alvos terapêuticos na intenção de diminuir os tratamentos de amplo espectro, como ciclosporinas e glicocorticoides, utilizando abordagens mais definidas, como produtos biológicos direcionados a citocinas chaves. Neste sentido, a IL-31 destaca-se quando se refere a DA canina (CORNELISSEN et al., 2012). As produtoras desta citocina são as células Th2, além de outras células imunes e queratinócitos, que também possuem receptores para IL-31 (GONZALES et al., 2013). A IL-31 pode ser associada a mediação do prurido (CORNELISSEN et al., 2012), além de modular a proliferação de queratinócitos bem como sua diferenciação (MOYAERT, 2017). As estratégias para atingir a IL-31 em cães incluem o uso de um anticorpo monoclonal para vacinar cães contra sua própria IL-31 (WOLLENBERG et al., 2020).

Como a DA é uma síndrome com mecanismos patológicos diferentes, nem todos os cães tratados com um imunobiológico visando esta resposta de citocina respondem satisfatoriamente, o que já é esperado. Porém, este tipo de conduta na área veterinária ainda é considerada de vanguarda, já que as terapias baseadas em imunobiológicos consistem em não se preocupar com interações medicamentosas e podem ser indicadas a pacientes com história de neoplasia ou demodicose, enquanto que os outros tratamentos não são indicados.

Tendo em conta a abordagem proativa na medicina veterinária (LOURENÇO et al., 2016),

faz-se importante fazer o possível para evitar as crises de DA canina, ao invés de esperar que aconteçam e só então iniciar o tratamento, o que geralmente é feito com terapia tópica em áreas que são propensas a crise, no intuito de minimizá-las (TAMAMOTO-MOCHIZUKI et al., 2019). Um medicamento comum utilizado de modo proativo é o lokivetmab (MUELLER, 2019). A imunoterapia específica para alérgenos ainda é considerada a única abordagem capaz de modificar o curso da doença e minimizar sensibilizações futuras (DEBOER, 2017). A imunoterapia alérgeno-específica é complementar a outros tratamentos, pois a eficácia é demorada.

Muita atenção também tem sido dedicada à identificação de biomarcadores (KLUKOWSKA- ROTZLER et al., 2013), embora não esteja claro neste momento se esses biomarcadores propostos estão associados a respostas específicas ao tratamento. Citocinas como linfopoietina estromal tímica (TSLP), timo quimiocina regulada por ativação (TARC) (ASAHINA et al., 2018), IL-33 (ASAHINA et al., 2020) e IL-34 (GOW et al., 2020) foram descritas em estudos recentes como possível biomarcadores, e mais investigações são necessárias para entender como estes são relevantes para uma grande população de cães atópicos.

À medida que se avança em direção a uma abordagem mais direcionada para o tratamento da DA canina, é razoável acreditar que mais produtos biológicos direcionados a essas citocinas ficarão disponíveis para cães. Muitas citocinas são produzidas pelos próprios queratinócitos (TSLP, IL-33) e estes podem modular a resposta dos linfócitos quanto aos alérgenos. Tais citocinas podem promover uma resposta inflamatória em vez de promover alguma tolerância (GOW et al., 2020).

Além disso, alguns mediadores liberados por queratinócitos como TSLP e periostina (MINESHIGE et al., 2018) são capazes de provocar diretamente a coceira agindo nos nervos sensoriais (MISHRA et al., 2020). Isso é particularmente relevante em doença crônica na qual o aumento da densidade das fibras nervosas (HNILICA, 2012) e aumento da sensibilização podem contribuir para uma resposta diminuída à terapia antipruriginosa.

Em resumo, é claro que muitos fatores diferentes desempenham um papel na formação do sistema imunológico em resposta a DA canina e que os queratinócitos e o microbioma da pele desempenham papel crucial na modulação da resposta imune aos alérgenos, bem como na modulação da inflamação e prurido. Assim, a gestão precisa ser multimodal com o intuito de restaurar a barreira da pele e biodiversidade enquanto se alivia a coceira e se trabalha para reeducação a longo prazo do sistema imunológico usando imunoterapia específica para

alérgenos. Cada paciente terá diferentes limites e necessidades de tratamento que podem mudar ao longo do tempo, uma vez que os fatores de exacerbação diminuem o limiar de doenças.

Diante das recidivas, há a necessidade de desenvolver um medicamento que seja seguro e fundamentalmente capaz de curar (DING et al., 2016; LOURENÇO et al., 2016). Assim, o desenvolvimento de vários tratamentos, como terapia com anticorpos e células-tronco desponta no tratamento da DA canina.

1.5.Novas estratégias: Biomateriais e Vesículas Extracelulares

Para o presente estudo, foram produzidas membranas compósitas de quitosana-xantana-hidroxiapatita, a partir das interações moleculares entre os polímeros quitosana e xantana e incorporação da hidroxiapatita, que apresentaram bons resultados para adesão e crescimento de células mesenquimais da polpa do dente de leite (NEVES et al., 2022; SOUZA et al., 2022).

Recentes estudos demonstram que os vidros bioativos podem ser utilizados para a cicatrização de tecidos moles como a pele, devido ao seu comportamento *in vitro* e *in vivo*, por exemplo, alta taxa de dissolução, que favorece a sua aplicação em processos regenerativos (KARGOZAR et al., 2019). O objetivo principal da incorporação da fase cerâmica (hidroxiapatita) é superar as propriedades mecânicas e biológicas das membranas poliméricas reabsorvíveis, além do produto final demonstrar não toxicidade e alta mucoadesividade. Com a incorporação da hidroxiapatita, pode-se estabelecer o comportamento apropriado quanto à dissolução deste composto e, conseqüentemente, aumentar a sua ação local, sem acarretar a perda da estabilidade da matriz dérmica. Além disso, a estrutura rugosa e a porosidade tornam estas membranas promissoras candidatas para o carreamento de células-tronco mesenquimais, por influenciar nos parâmetros de adesão e proliferação celular, bem como para a sua associação com fatores indutores (tais como as vesículas extracelulares) (BELLINI et al., 2015; BIERHALZ e MORAES, 2016; BARBOSA et al., 2019 e NEVES et al., 2022).

As células tronco possuem um grande potencial regenerativo e de reparação tecidual, e seu uso em medicina translacional se faz cada vez mais interessante. Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), as células-tronco mesenquimais (CTM) são definidas como as células com capacidade de se aderir à superfície do plástico, demonstram multipotencialidade ao se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, miócitos e adipócitos, além de expressarem marcadores como CD73, CD90, CD105 e CD166 e baixa expressão de vários marcadores, incluindo CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006).

As fontes de CTM mais descritas na literatura são: medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária, placenta e sangue menstrual (PITTENGER et al., 1999; ZUK et al., 2002; SECCO et al., 2008; DE MENDONÇA et al., 2008). Segundo DOMINICI (2006), CTM de diferentes fontes também podem apresentar diferentes morfologias, taxas de proliferação, capacidade de diferenciação e auto renovação. Entretanto, independente da fonte, a capacidade de diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos, miócitos e adipócitos é comum em todas elas. Ainda não se possui a total compreensão do mecanismo de ação das CTM durante a terapia celular. Entretanto, é aceito que as CTM podem agir por duas vias: 1) mecanismo parácrino, secretando fatores que recrutam e orientam o reparo tecidual, ou 2) via diferenciação celular, tornando-se em células maduras e especializadas que irão agir no tecido específico danificado.

As CTM e suas vesículas extracelulares (VE) são agentes terapêuticos promissores também para uso na regeneração do tecido epitelial. A facilidade de disponibilidade, isolamento e expansão *in vitro* tornam as CTM as melhores candidatas para terapias regenerativas em feridas de pele, em comparação com outras células-tronco, incluindo células-tronco embrionárias, devido a capacidade de se diferenciar em diferentes células da epiderme. Portanto, as CTM e suas VE podem ser aplicadas diretamente na área ferida, por injeção ou incorporadas a curativos bioativos, auxiliando no processo regenerativo de feridas que não cicatrizam (AL-SHAIBANI et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Acompanhar a cicatrização em modelo de dermatite atópica em ratos tratados com biomaterial composto por hidroxiapatita, quitosana e vesículas extracelulares provenientes de células tronco de polpa de dente de leite.

2.2. Objetivos Específicos

Nos animais induzidos a dermatite atópica e tratados ou não com o biomaterial:

- Analisar as lesões macroscopicamente e histopatologicamente
- Estudar os mastócitos
- Verificar a expressão da proteína Anexina A1, JAK1 e JAK3
- Dosar no plasma e/ou no sobrenadante do macerado de pele a histamina, as citocinas IL1- β , IL-6, IL-10, IL-31 efator de necrose tumoral (TNF)- α e os fatores de crescimento epidérmico (EGF) e vascular endotelial (VEGF).

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma de um manuscrito, de acordo com as normas da revista *Research in Veterinary Science*.

Efeito da associação de biomateriais e vesículas celulares na reparação tecidual em modelo de dermatite atópica em ratos

Vidotti RB^{a,b}, Yoshikawa AH^{a,c}, Sant'Ana M^{a,d}, Souza HR^a, Possebon, L.^a, Navarro da Rocha, D^c, Ferreira JRM^c, Vidotti GAG^{a,f}, Girol AP^{a,b,d,*}

^aExperimental and Clinical Research Center (CEPEC), Padre Albino University Center (UNIFIPA), Catanduva, SP, Brazil;

^bDepartment of Biology, Graduate Program in Biosciences, São Paulo State University, (UNESP), São José do Rio Preto Campus, SP, Brazil;

^cBiochemistry and Molecular Biology Research Center, Graduate Program in Health Sciences, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil;

^dGraduate Program in Functional and Structural Biology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil.

^eCompany R-Crio Criogenia S.A, Campinas, SP, Brazil

^fFederal University of São Paulo, Department of Gynecology, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), São Paulo, Brazil

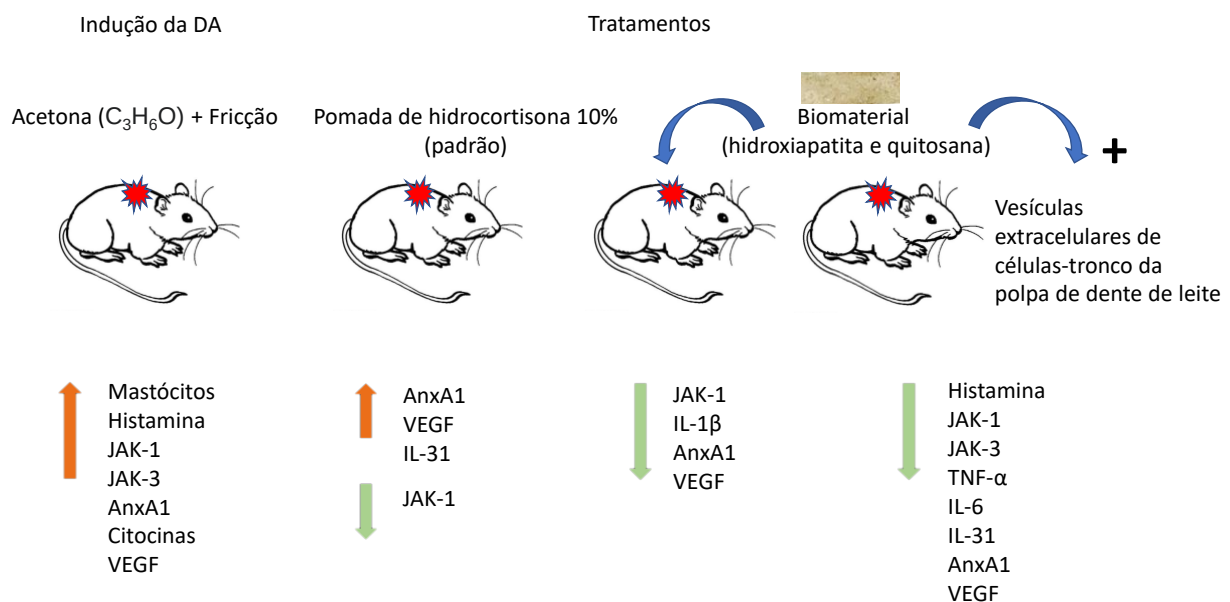
Resumo

Introdução: A dermatite atópica (DA) é a dermatopatia alérgica mais prevalente em cães e novas terapias são necessárias. Nesse sentido, biomateriais e vesículas extracelulares (VE) de células-tronco mesenquimais são interessantes, pois influenciam na regeneração tecidual. **Objetivos:** avaliar a cicatrização cutânea em ratos induzidos à manifestação da DA e tratados com biomaterial composto de hidroxiapatita e quitosana associado ou não a EV de células-tronco da polpa do dente de leite. **Métodos:** A DA foi induzida no dorso dos animais por fricção de acetona por 5 min, por três dias, sob sedação. Os tratamentos começaram no dia 3 e duraram 5 dias. Os grupos DA (n=5/grupo) foram: induzido sem tratamento (DA), tratado com pomada de hidrocortisona (TH) a 10% (tratamento padrão, 1x/dia), tratado com biomaterial sem VE (TB) e com VE (TBVE), aplicado uma vez como curativo. Aos 8 dias pós-indução, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e fragmentos de pele para estudos histopatológicos e imuno-histoquímicos e dosagens de mediadores químicos. **Resultados:** Os grupos DA e TH apresentaram ruptura e hiperplasia da epiderme e influxo inflamatório. O grupo DA apresentou o maior número de mastócitos, principalmente degranulados. Já os grupos TB e TBVE apresentaram pele menos espessada, em melhor processo de recuperação, e mastócitos

reduzidos. Os níveis de histamina plasmática também foram reduzidos no grupo TBEV. As expressões de anexina A1 (AnxA1) e Janus quinase (JAK)-1 foram elevadas na epiderme dos grupos DA e TH e diminuídas nos grupos tratados com biomateriais, especialmente TBVE. Da mesma forma, as células positivas para JAK-1 e JAK-3 foram reduzidas pelos tratamentos com biomateriais. Além disso, os tratamentos com TB e TBVE reduziram os níveis de fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Conclusão: Os tratamentos com biomateriais especialmente associados à VE reduziram o processo inflamatório e estimularam a regeneração tecidual na DA com perspectivas de aplicação terapêutica.

Palavras-chave: cicatrização cutânea, mediadores inflamatórios, polpa de dente de leite, células-tronco mesenquimais, hidroxiapatita, quitosana

Graphical Abstract



1. Introdução

A Dermatite Atópica (DA) acomete tanto seres humanos quanto animais. A DA canina tornou-se cada vez mais comum devido ao aumento da exposição a ambientes internos e mudança de dieta, com a introdução de alimentos processados (Marsella, 2021). A DA canina possui características comuns a DA humana tanto clínicas quanto imunológicas (Cosgrove et al, 2015; Pucheu-Haston, 2016). Embora a causa da DA canina não seja clara, sabe-se que há alteração da barreira cutânea e da resposta imunológica como resultado de interações complexas, como fatores

genéticos (mutação da filagrina), fatores ambientais (alérgenos) e desequilíbrio da função imunológica (Pucheu-Haston, 2016; Jassies-Van Der Lee, 2014; Schotter et al, 2011; Roesner et al, 2016).

A barreira cutânea sofre uma falha, facilitando a entrada de alérgenos e agentes microbianos, que por sua vez, são fagocitados pelas células de Langerhans e transportados aos linfonodos regionais, que produzem imunoglobulinas do tipo E (IgE), que se ligam a basófilos e mastócitos, resultando em degranulação e liberação de fatores como proteases, histamina e citocinas, em uma reação de hipersensibilidade do tipo I (Olivry et al, 2010).

Há uma grande complexidade quando se refere a rede de citocinas atuantes em processos de alergia e prurido. A Interleucina-31 (IL-31) é secretada pelos linfócitos T helper do tipo 2 (Th2) e seu mecanismo está relacionado com a ligação de um receptor que desencadeia a via Janus quinase (JAK)/ transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição (STAT) (JAK/STAT). Consequentemente, gera uma resposta do sistema nervoso criando assim um ciclo vicioso envolvendo a interação neuroimune e o prurido, chamando assim de ciclo de coceira (Calsavara et al, 2017; Nuttal, 2013). Investigações indicam que os inibidores de JAK são seguros e eficazes em várias condições inflamatórias da pele, incluindo o tratamento para DA (Nezamololama et al, 2020).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) facilita a regeneração das células epidérmicas e desempenha um papel essencial no processo de cicatrização de feridas dérmicas, estimulando a proliferação e migração de queratinócitos. O tratamento com EGF pode estabilizar a desgranulação de mastócitos, reduzindo assim a liberação de produtos granulares nas lesões da mucosa gástrica de ratos. Ainda, a produção de IL-17A e a expressão de IL-6 e IL-1 β na pele com DA induzida por alérgenos foram atenuadas pelo tratamento com EGF. No entanto, os efeitos clínicos e os mecanismos do EGF não foram totalmente elucidados (Kim et al, 2022).

A inflamação da pele na DA parece estar ligada a alterações vasculares. Mastócitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos são as principais fontes de fatores angiogênicos e linfangiogênicos. Os mastócitos de lesões de DA estimulam a angiogênese pela liberação de fatores pró-angiogênicos, incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)-A e VEGF-B. A secreção de VEGF pelos mastócitos é aumentada pelo par de receptores IL-9/IL-9, cujo nível é elevado na DA (Lee et al, 2021).

Ainda, entre os mediadores anti-inflamatórios que podem representar um papel na DA estão a proteína endógena Anexina A1 (AnxA1) e o seu peptídeo mimético Ac2-26, devido suas ações antialérgicas, através da inibição da degranulação de mastócitos e liberação de histamina, bem como da redução do acúmulo de neutrófilos e eosinófilos (Gobbetti e Cooray, 2016). Na dermatite atópica (DA) induzida por ovalbumina em camundongos nocautes para AnxA1, a

ausência da proteína aumentou a IgE e ativação dos mastócitos demonstrando exacerbação da resposta alérgica (Parisi et al, 2019).

Apesar da DA ser uma doença crônica, o prognóstico é bom quando em uso de terapia de controle, contudo as recidivas são comuns. Diante disso, a terapia mais comumente utilizada é a administração de corticosteroides pela via oral ou tópica. Apesar da eficiência, estes medicamentos podem acarretar muitos efeitos adversos e necessita de acompanhamento profissional para realização de exames de rotina e ajuste de dose (Guidolin, 2009).

Outras terapias incluem anti-histamínicos, que podem ser utilizados com intuito de diminuir as dosagens de corticoides, o tacrolimus usado como substituto dos glicocorticoides tópicos, principalmente nos animais em que as lesões são localizadas (Olivry, 2010), a ciclosporina para redução da resposta imunológica e da reação alérgica (Little et al, 2015) e o maleato de oclacitinib, que deve ser utilizado apenas em animais com idade acima de doze meses (Little et al, 2015). Contudo, todas apresentam algum tipo de limitação, impossibilidade de uso em lesões ulceradas, demora para aparecimento dos efeitos e diferentes efeitos colaterais especialmente com uso crônico (Olivry et al. 2010; Little et. al. 2015; Deboer, 2014; Deboer, 2017). Há ainda o anticorpo monoclonal caninizado, Lokivetmab, feito em sua maior parte por sequências de IgG de cães, que se liga IL-31 impedindo sua associação ao receptor e evitando assim os efeitos pruriginogênicos desta citocina (Olivry, 2017).

Uma estratégia que se apresenta simples e elegante enquanto conceito é a utilização de biomateriais. Investigações vêm destacando os efeitos das vesículas extracelulares (VE), provenientes de células-tronco mesenquimais (CTM), na diferenciação celular e na imunomodulação. Entretanto, para uma melhor compreensão destes fatores, é necessário o conhecimento da biologia das CTM para a concepção de novas propostas de utilização das VE como, por exemplo, fatores biológicos com funções na regeneração tecidual (Dostert et al, 2017; Fatima et al, 2017). Assim, como outras células, as CTM liberam vesículas com cargas bioativas para o meio extracelular, compostas por proteínas e lipídios, RNAs codificados e não codificado (ncRNAs), incluindo os microRNAs e RNAs não codificantes longos (miRNAs, lncRNAs) (Bellini et al, 2015). Estas VE, secretadas pelas células, atuam como mediadores na comunicação intercelular, com função de disseminar informações biológicas e contribuir para fatores parácrinos (Bellini et al, 2015; Fatima et al, 2017). Estudos atuais propõem que pelo menos uma parte dos efeitos da CTM são mediados por VE secretadas (Bellini et al, 2015).

A potencial combinação deste tipo de membrana com agentes capazes de induzir uma desejada e controlada resposta biológica nas células pode acelerar o processo de regeneração tecidual causada pela DA, reduzindo o tempo de regeneração das feridas e diminuindo o número de tratamentos.

2. Materiais e métodos

2.1. Membrana compósita de quitosana-xantana-hidroxiapatita associadas com vesículas extracelulares (Biomaterial)

Para o presente estudo, foram produzidas membranas compósitas de quitosana-xantana-hidroxiapatita, a partir das interações moleculares entre os polímeros quitosana e xantana e incorporação da hidroxiapatita, que apresentaram bons resultados para adesão e crescimento de células mesenquimais da polpa do dente de leite (Neves et al. 2022; Souza et al 2022).

As membranas utilizadas no ensaio *in vivo* foram previamente esterilizadas pela empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. (Campinas, SP, Brasil) em uma mistura de gás composta de 30% de óxido de etileno e 70% de dióxido de carbono, com exposição por 8 horas, 40°C e umidade relativa de 30 a 80%. Este processo ocorreu aplicando vácuo por 15 minutos, com posterior entrada da mistura do gás até uma pressão de 0,5 kgf/cm². Ao término deste processo, as amostras foram aeradas por 10 min com ar filtrado.

2.1.1 Produção das membranas quitosana-xantana-hidroxiapatita (mQXHA)

A produção das membranas foi realizada de acordo com o método descrito por Neves et al (2022) e Souza et al (2022), sendo preparados suportes densos na razão mássica de 1:1 de quitosana e xantana. A solução de quitosana a 1% m/v (Sigma-Aldrich, Cat. 448877, 83% de desacetilação), foi preparada em solução composta de 2% v/v de ácido láctico (Merck, Cat. W261106) dissolvido em água ultrapura (Milli-Q Direct Q 8/16 System) e homogeneizada em agitador mecânico (Tecnal, impelidor náutico), com uma rotação de 1000 rpm.

Nesta etapa, foi preparada uma solução precursora rica em íons cálcio e fosfato, apresentando uma razão molar Ca/P igual a 1,67. Após 24 horas em agitação, adicionou-se uma solução de 1 mol/L hidróxido de potássio (Synth) para o pH ser ajustado a fim de alcançar valor de 12 e permitir a precipitação da hidroxiapatita (Neves et al 2021; Lopes et al, 2021). Posteriormente, a goma xantana (Sigma, Cat. G1253) foi dissolvida a 1% m/v em solução de hidroxiapatita e homogeneizada em agitador mecânico (Tecnal, impelidor náutico), com uma rotação de 1000 rpm.

Em seguida, 250 mL de solução de quitosana foram adicionados a 250 mL de solução de xantana-hidroxiapatita com o auxílio de uma bomba peristáltica (Tecnal) a uma taxa de 5 mL/min, temperatura de 25°C, sob agitação constante de 2000 rpm. Após a mistura, a solução permaneceu em agitação mecânica a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, alíquotas de 70 mL das soluções foram distribuídas em placas de Petri de 150 x 15 mm² e secas por 48 horas em bancada, sob temperatura de 24°C e umidade de 59% (Incoterm, modelo: 7663.02.0.00). Ao final, as

membranas foram levadas em estufa a 37°C por 24 horas e, em seguida, cortadas em dimensões de 3 cm x 1 cm.

2.1.2 Produção do Meio Condicionado

Para a produção do meio de cultura condicionado, as células-tronco mesenquimais de polpa dentária humana utilizadas pela empresa R-Crio® foram obtidas a partir de uma amostra padronizada adquirida da empresa Lonza (Cod. PT-5025), e armazenadas em criotubos em nitrogênio líquido no banco de células da empresa. Quando necessário, as células foram descongeladas e ressuspensas em meio Xeno-Free *Human Mesenchymal – XF Expansion Medium* (Sigma–Aldrich, SCM045). O conteúdo foi homogeneizado e submetido a centrifugação a 200 x g (Sieger, modelo Siruis 4000). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 10 mL de meio Xeno-Free *Human Mesenchymal – XF Expansion Medium* suplementado com 8% v/v de soro humano (Sigma–Aldrich, – Código H4522), 2mM L-glutamina (Sigma–Aldrich, Cat. 59202C) e 1,1% v/v penicilina/estreptomicina (Sigma–Aldrich, P4333), 0,1µM dexametasona, 50 µM ascorbate – 2 – phosphate e 10mM β-Glycerophosphate. Este conteúdo foi inoculado em garrafa de 75 cm² e as células de 2ª passagem foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ (Panasonic, MCO-19AIC UV) até verificação de confluência entre 70 e 80%, por microscopia óptica (Zeiss, modelo Primovert). O meio condicionado foi coletado quando as células atingiram 70% a 80% de confluência, dentro de 14 dias de cultivo. Ao final, o meio condicionado foi congelado em freezer (Analytical, modelo HOTA 20FL) por 24 horas à temperatura de -20°C e, posteriormente, foi liofilizado (Christ, modelo Alpha 1-2) por 48 horas sob vácuo inferior ou igual a 0,040 mbar (Ferreira et al, 13/10/2020; BR102019005811A2).

Antes das lesões serem realizadas com os animais, uma concentração de 4 mg/ml de meio condicionado foi associada em às membranas (biomaterial) para posterior aplicação nas feridas.

2.2. Experimentos *in vivo*

2.2.1. Alteração da barreira cutânea para indução da DA

Foram utilizados Ratos Wistar machos pesando (250±10) g (n=20) provenientes da Unidade Didática e Pesquisa Experimental -UDPE do Centro Universitário Padre Albino- UNIFIPA, Catanduva, SP. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (entre 20°C e 24°C), ciclo claro/escuro de 12h e comida e água *ad libitum* e alimentados com ração padrão (Nuvilab CR, Quimtia. Paraná, Brasil). Os procedimentos de experimentação animal foram conduzidos em harmonia com as regras aplicadas pelo CEUA- UNIFIPA (protocolo de aprovação 02/21).

Os pelos dorsais dos ratos foram removidos (6 cm x 6 cm) 24h antes das experiências com auxílio de um barbeador elétrico, seguido da aplicação tópica de um creme depilatório. Para

modificar barreira epidérmica do animal a área depilada do dorso foi exposta à acetona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) aplicada com um algodão embebido durante 5 min (Barcelos et al, 2013). Este procedimento foi realizado durante três dias consecutivos, sob sedação induzida por inalação de isoflurano para prevenir qualquer estímulo estressante ao animal.

Avaliação da ação de coçar foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Okawa (2012). Uma hora após a última exposição cutânea à acetona, cada animal foi colocado individualmente em uma caixa plástica e aclimatados ao ambiente experimental durante 5min. O número de ações de coçar foi mensurado durante 30 min. Uma ação de coçar corresponde a uma série de movimentos em direção a pele dorsal usando as patas traseiras, e expresso como o número de atos para cada animal durante 30 min.

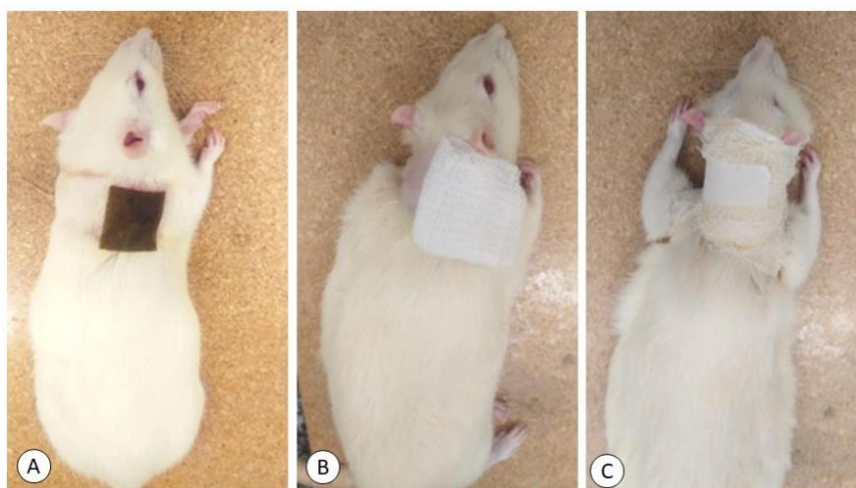
Após a análise comportamental da ação de coçar, a fisiologia da pele foi avaliada por meio de método não-invasivo, proporcionando a medição qualitativa da barreira epidérmica e da microcirculação local, sob sedação.

2.2.2 Protocolos de tratamento

Os animais induzidos a DA foram divididos em 4 grupos (n=5/grupo): Induzidos sem tratamento (DA), tratados com pomada de hidrocortisona a 10% (TH) (tratamento padrão), Tratados com biomaterial sem VE (TB) e Tratados com biomaterial com VE (TBVE). Os tratamentos foram iniciados no terceiro dia pós-indução, após confirmação da DA pelas análises de fisiologia da pele e atos de coçar, e seguiram até o oitavo dia. No grupo tratado com a pomada, a aplicação foi diária (1x/dia).

Já, os biomateriais foram aplicados uma única vez da seguinte forma: o biomaterial foi retirado de embalagem estéril e umidificado com soro fisiológico 0.9% também estéril para melhor aderência à lesão. Foram então, posicionados no dorso do animal, exatamente em cima da lesão e após foi realizado a cobertura com gaze estéril e enfaixada (Figura 1) para seu efeito em 5 dias. Por se tratar de um novo produto, o tempo de permanência do biomaterial junto ao tecido lesado foi estimado através do estudo de Gompelman e colaboradores (2016), que indica o uso de biofilmes para regeneração de feridas de 5-7 dias. Aos 8 dias pós-indução, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico para a coleta dos retalhos de pele.

Figura 1: Aplicação do biomaterial. (A), cobertura com gaze (B) e bandagem (C).



2.2.3 Análises macroscópicas e histopatológicas

No 3º e 8º dias após a indução da lesão, as feridas dos animais de todos os grupos foram fotografadas e observadas para acompanhamento do fechamento da ferida nos diferentes grupos. Os animais foram eutanasiados no 8º dia pós indução da lesão para coleta dos retalhos das lesões de todos os grupos.

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas, as alíquotas foram centrifugadas por 15 min a 3.000 RPM e o plasma congelado a -70°C para posterior dosagem de citocinas inflamatórias. Fragmentos das lesões foram fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. Outros fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer - 70°C para análises posteriores.

Secções de 4µm do material incluído em parafina foram usadas para análises histopatológicas e imuno-histoquímicas. O processo de cicatrização da pele foi avaliado clinicamente por meio de análises histopatológicas pela coloração hematoxilina-eosina (HE) e a avaliação de mastócitos. A espessura da pele (epiderme + derme) e a epiderme isolada foram avaliadas com uma objetiva de 10x. Para cada animal, 10 medidas da epiderme + derme de apenas a epiderme foram feitas em intervalos aleatórios usando o software *Leica Image Analysis*. Os valores são apresentados como média ± SEM da espessura (mm) obtida nos diferentes grupos experimentais (Parisi et al, 2019).

Os mastócitos (MCs) foram corados pelo Azul de Toluidina a 0,1% e avaliados de acordo com suas características morfológicas em intactos (grânulos metacromáticos citoplasmáticos) e degranulados (grânulos citoplasmáticos espalhados). A quantificação dos mastócitos nos fragmentos de pele foi realizada em 10 imagens por lâmina, obtidas pela objetiva de 40X no microscópio *Leica* (DM500) do Laboratório Multidisciplinar das UNIFIPA, Catanduva-SP. As

áreas de cada tecido foram obtidas com o auxílio do *software Leica Image Analysis*. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (S.E.M.) do número de MCs por mm² (Souza et al, 2017).

2.2.4 Análises Imuno-histoquímica

Os estudos imuno-histoquímicos foram realizados em secções de 4 μ m das amostras de todos os grupos. Os cortes passaram por recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e foram incubados *overnight* com o anticorpo primário da proteína AnxA1 (1:100) (Invitrogen, Camarillo, CA, USA), JAK-1 (1:200) (Elabscience, USA) e JAK-3 (1:200) (Elabscience, USA) diluídos em BSA 1% em câmara úmida a 4°C. Após isso, incubados com o anticorpo secundário biotinizado (*kit Zymed Invitrogen*), e a seguir, revelados em substrato diaminobenzidina (DAB) (*kit Zymed Invitrogen*), contracolorados com Hematoxilina e montados. As análises das imunomarcações da AnxA1 e JAK-1 na epiderme foram realizadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 250) e 20 pontos aleatórios foram analisados em seis imagens por lâmina, usando a objetiva de 40x. e pelo programa analisador de imagem *Leica Image Analysis* (Souza et al. 2017). As quantificações das células JAK-1 e JAK-3 imunomarcadas foram feitas conforme descrito para a quantificação dos mastócitos.

2.2.5 Preparação dos macerados de pele para dosagem de mediadores inflamatórios

Fragmentos das lesões foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em tubos eppendorfs. Ao macerado e ao plasma foram adicionados 500 μ L de solução contendo coquetel inibidor de proteases (*Complete Mini EDTA-free, Roche Applied Science, Mannheim, Germany*) e fosfatases (*PhosSTOP, Roche Applied Science, Mannheim, Germany*). Para o preparo dessa solução, uma pastilha do inibidor de protease e outra do inibidor de fosfatase foram dissolvidas em 10mL de tampão de lise. O material foi incubado por 1 hora, a 4°C, sob agitação constante e, em seguida, centrifugado a 14.000RPM por 10 minutos, a 4°C, sendo os sobrenadantes coletados e imediatamente congelados a -70°C. A quantidade de proteínas totais foi obtida pelo método de Bradford.

2.2.6 Dosagem de histamina, citocinas e fatores de crescimento

Sobrenadantes dos macerados das lesões e de plasma foram usados para as dosagens de histamina, citocinas e fatores de crescimento, tendo como objetivo as análises locais e periféricas.

A dosagem da histamina foi realizada por ELISA, com kit comercialmente disponível e de acordo com as instruções do fabricante. As citocinas IL1- β , IL-6, IL-10, e TNF- α e os fatores de

crescimento EGF e VEGF foram dosadas pelo Kit *MILLIPLEX MAP* de rato (RECYTMAG-65K; *Millipore Corporation, EUA*) e analisadas no equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (*Millipore Corporation, EUA*) do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP. As *beads* magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados e homogeneizados conforme as instruções descritas no Kit. Os dados foram expressos como média $\pm$ S.E.M. de ng de proteína/mL

A análise de IL-31 foi realizada por *Western blotting* no sobrenadante do macerado de pele. Para isso, uma alíquota foi misturada (1:1) com tampão de carregamento 2X (125 mM Tris base, pH 6,8, contendo 2 mM de ácido etilenodiamina tetraacético, 10% de mercaptoetanol, 4% de dodecil sulfato de sódio, 20% de glicerol, 0,1% de azul de Coomassie) e desnaturado em água a 100°C por 5 minutos. Amostras (20 μ g de proteína por poço) e marcadores de peso molecular foram separados em gel SDS-PAGE (10% de dodecil sulfato de sódio – 10% de gel de poliacrilamida) e posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A IL-31 foi detectada usando o anticorpo anti-IL-31 (1:1000) (Abclonal - Abcam, Cambridge, MA, EUA). O controle de reação foi realizado com anticorpo anti-tubulina- α (1:1000) (Sigma-Aldrich, EUA). O sinal foi amplificado usando anticorpos secundários IgG anti-coelho conjugados com HRP (Promega) e o produto da reação visualizado com coloração DAB (Kit DAB, Invitrogen). Para a análise densitométrica a IL-31 foi quantificada usando o software Leica Image Analysis.

2.2.7 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade. Como as amostras apresentaram distribuição normal, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste de *Bonferroni*. Todos os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados

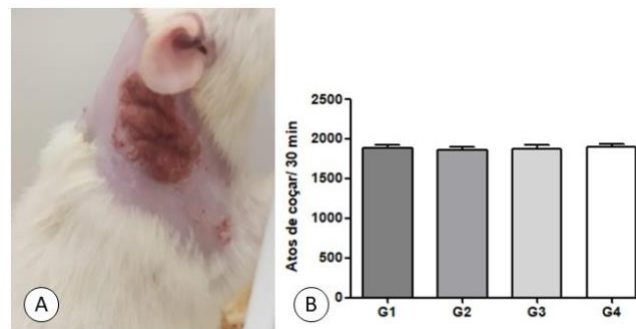
3.1. Confirmação da indução da DA pela avaliação da fisiologia da pele e análise comportamental

O modelo usado, de fricção com acetona, promoveu a alteração da barreira cutânea. Através da avaliação clínica, no terceiro dia da indução, os animais apresentavam-se irritados e a avaliação da fisiologia da pele mostrou lesão atópica clássica, com hiperemia, aumento de lesão crostosa e sobretudo pruriginosa (Figura 2A). A sensação de coceira foi intensa e os animais se coçaram cerca de 1900 vezes por 30 min (Figura 2B)

Essas características coincidem com as estabelecidas para a DA (Okawa, 2012) e confirmam a

validade do modelo. Diante do estabelecimento da DA em todos os animais induzidos, foi feita a destinação dos grupos, respectivamente como: DA, TH, TB, TBVE.

Figura 2: Indução do Modelo de Dermatite Atópica. Lesão estabelecida (3 dias de indução). A) pele hiperemiada, com prurido e espessada. B) gráfico dos atos de coçar indicando similaridade entre os animais de todos os grupos.

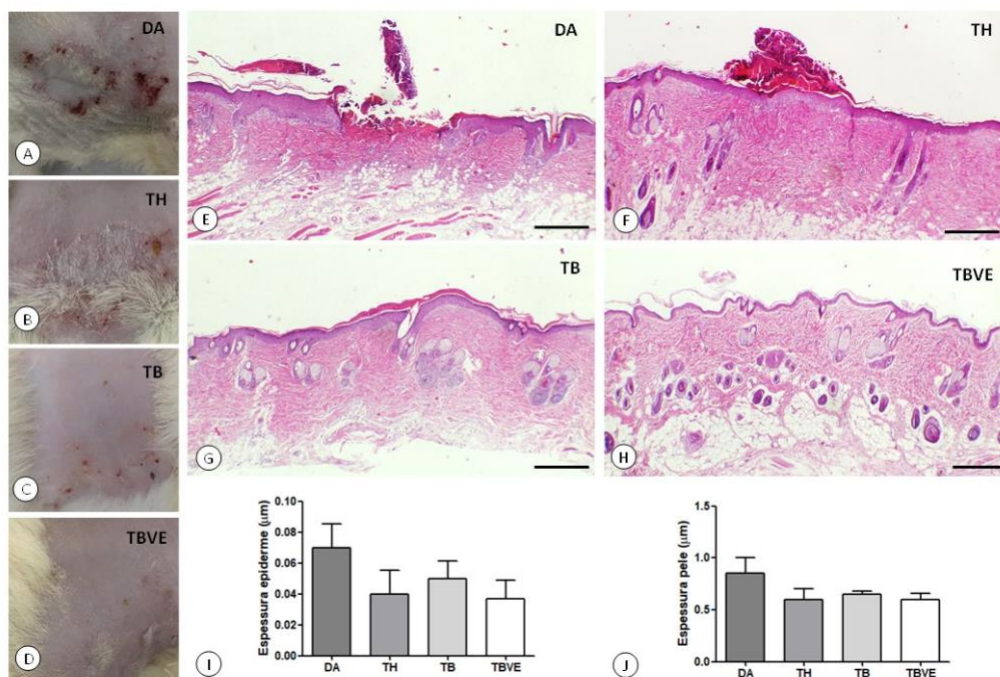


3.2. Análises macroscópicas e histopatológicas.

Após cinco dias de tratamento (oitavo dia após indução), os animais induzidos a DA apresentaram pele descamada, alopecia e hiperpigmentação (Figura 3A). Os animais tratados com hidrocortisona a 10%, tratamento padrão (TH) apresentaram melhora quanto ao tamanho da lesão, porém, ainda com regiões crostosas e hiperemiadas (Figura 3B). Já os tratamentos com o biomaterial tanto sem vesículas extracelulares (TB) (Figura 3C) quanto com vesículas extracelulares (TBVE) (Figura 3D) apresentaram melhora substancial em relação a lesão.

Em relação as análises histológicas pela coloração HE, os animais com lesão cutânea (DA) (Figura 3E, I, J) apresentaram hiperplasia da epiderme, influxo inflamatório e epidermerompida. Os animais do grupo TH (Figura 3F, I, J) embora com regiões de pele regeneradas ainda apresentaram locais com epiderme rompida, com infiltrado inflamatório aumentado que invade a epiderme e derme em espessamento. Diferentemente, os animais dos grupos TB (Figura 3G, I, J) e TBVE (Figura 3H, I, J) mostraram a pele menos espessada, em melhor processo de recuperação. Essas observações confirmam os achados macroscópicos.

Figura 3: Análise macroscópica e histopatológica das lesões. Animais sem tratamento (DA) com lesão mais evidente (A e E), animais tratados com pomada de hidrocortisona 10% (TH), com algumas regiões de lesão (B e F), animais tratados com biomaterial sem vesículas extracelulares (TB) com melhor regeneração tecidual (C e G) e animais tratados com biomaterial com vesículas extracelulares (TBVE), com pele regenerada, após 5 dias de tratamento e 8 dias pós indução. (D e H). Comparativo de espessuras da epiderme (I) e pele (J). Coloração: HE. Barras: 500 µm.

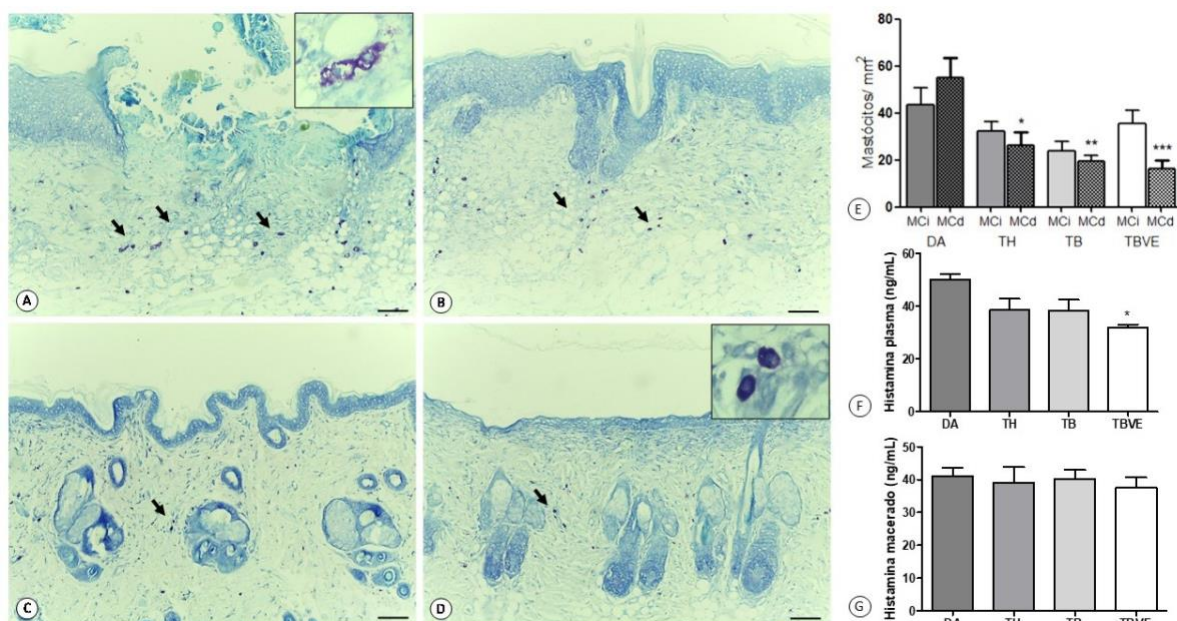


3.3. Quantificação dos mastócitos e dosagem de histamina

A coloração com Azul de Toluidina permitiu a observação dos mastócitos, localizado na derme papilar e reticular (Figura 4), na sua forma intacta (MCi), com grânulos citoplasmáticos metacromáticos (detalhe, Figura 4D, bem como mastócitos degranulados (MCd), em estado de ativação, com grânulos espalhados (detalhe, Figura 4A). O grupo DA apresentou a maior quantidade de mastócitos, principalmente degranulados (Figura 4A e E). Todos os tratamentos promoveram a redução dos mastócitos, em especial os degranulados (TH, $p < 0,05$; TB, $p < 0,01$; TBVE, $p < 0,001$) (Figura 4B-E).

Os níveis de histamina foram analisados no plasma sanguíneo (Figura 5F) e macerado das lesões (Figura 4G). Esses níveis foram reduzidos no plasma após o tratamento com TBVE ($p < 0,05$).

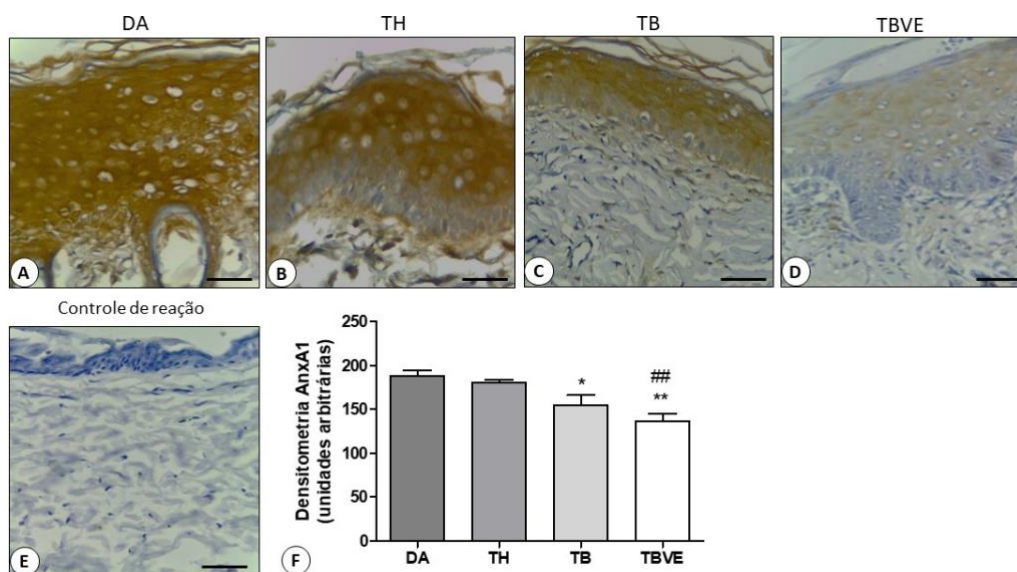
Figura 4: Análises dos mastócitos na pele no modelo de DA e tratamentos. Numerosos mastócitos (setas) no grupo sem tratamento (A) e redução dessas células após os tratamentos (B, C e D). Nos detalhes, características histopatológicas das células intactas (D) e degranuladas (A). Coloração Azul de Toluidina. Barras: 100 μm . Quantificação dos mastócitos intactos (MCi) e degranulados (MCd) (E). Os dados estão representados como média $\pm$ S.E.M. do número de MCs por mm^2 ($n = 5/\text{grupo}$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs MCd DA. Níveis de histamina no plasma sanguíneo (F) e no macerado de pele (G). Dados como $\pm$ S.E.M. ($n = 5/\text{grupo}$) (F). * $p < 0,05$ vs DA.



3.4. Análises imuno-histoquímicas para detecção das proteínas AnxA-1, JAK-1 e JAK-3.

Nas análises de AnxA1, o grupo DA não tratado (Figura 5A) e o que recebeu o tratamento padrão, TH (Figura 5B) mostraram forte expressão da proteína na epiderme. Diferentemente, nos grupos tratados com os biomateriais, a expressão foi reduzida, especialmente nos animais do grupo TBVE (Figura 5C e D). As avaliações densitométricas (Figura 5F) corroboraram as observações imuno-histoquímicas e indicaram redução da imunorreatividade da AnxA1 nos grupos TB ($p < 0,05$) e TBVE ($p < 0,01$) comparados aos animais DA. Também houve redução na expressão da AnxA1 nos animais TBVE comparados com o tratamento padrão ($p < 0,01$). A ausência de marcação no controle de reação indicou a especificidade do anticorpo (Figura 5E).

Figura 5 - Expressão da AnxA1 no modelo de DA e tratamentos. Intensa imunorreatividade para a proteína na epiderme do grupo não tratado (A) e com tratamento padrão (B). Menor expressão da AnxA1 após os tratamentos com biomateriais (C e D) Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 50µm. Ausência de imunorreatividade no controle de reação (E). **Análises densitométricas.** Os dados são representados como como média $\pm$ S.E.M. ($n=5$ /grupo) (F). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs DA; ## $p < 0,05$ vs TH.

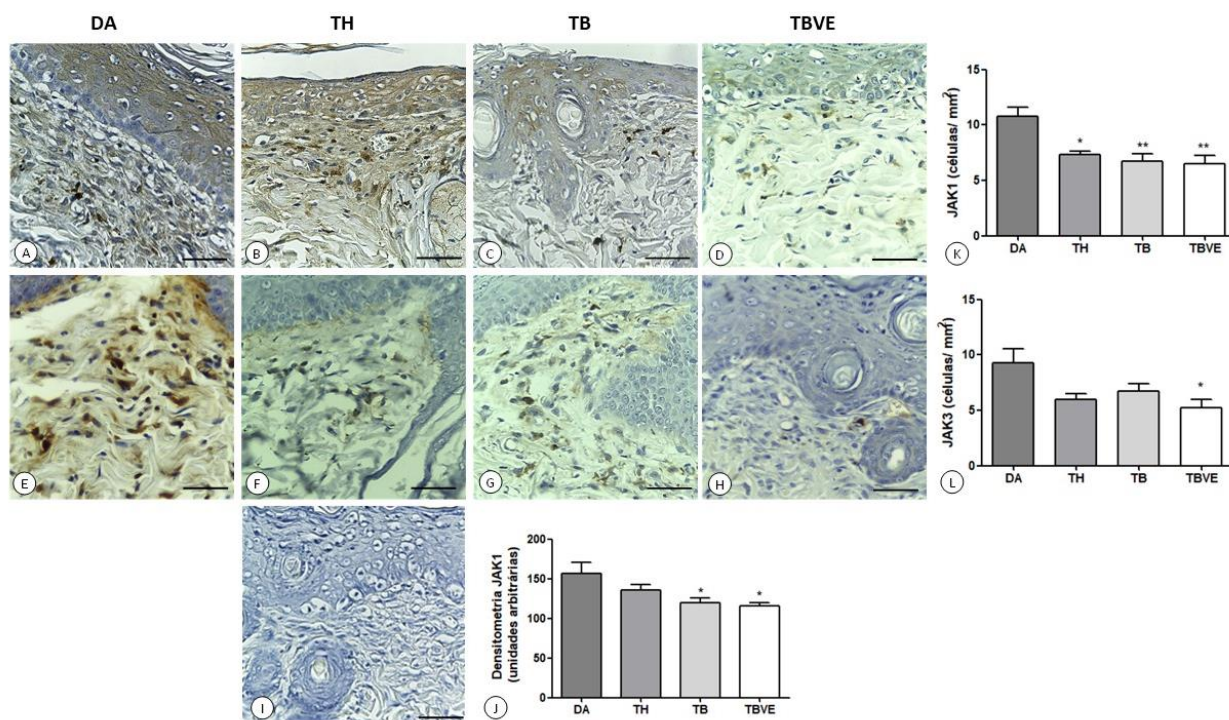


Similarmente, os tratamentos com biomaterial reduziram a expressão da JAK-1 na epiderme (Figura 6A-D). Células imunorreativas para JAK-1 (Figura 6A-D) e JAK-3 (Figura 6E-H) foram observadas e quantificadas na derme dos animais de todos os grupos. Todos os tratamentos diminuíram o número de células positivas para JAK-1 (Figura 6K) e no grupo TBVE também houve redução das células positivas para JAK-3 (Figura 6L) com relação aos animais não tratados. O controle de reação confirmou a especificidade das marcações (Figura 6I).

Figura 6 - Imunomarcacão para JAK-1 e JAK-3 na pele no modelo de DA: JAK-1 (A-D) e JAK-3 (E-H). Várias células positivas para JAK-1 e JAK-3, no grupo não tratado (A e E). Menor quantidade de células JAK-1 positivas após todos os tratamentos (B,C e D) e de células JAK-3 positivas no grupo TBVE. Ausência de marcação no controle de reação (I). Contra- coloração: Hematoxilina. Barras 50 μ m.

Análises densitométricas de JAK-1 na epiderme. Dados como média $\pm$ S.E.M. (n=5/grupo) (J). * $p < 0,05$ vs DA

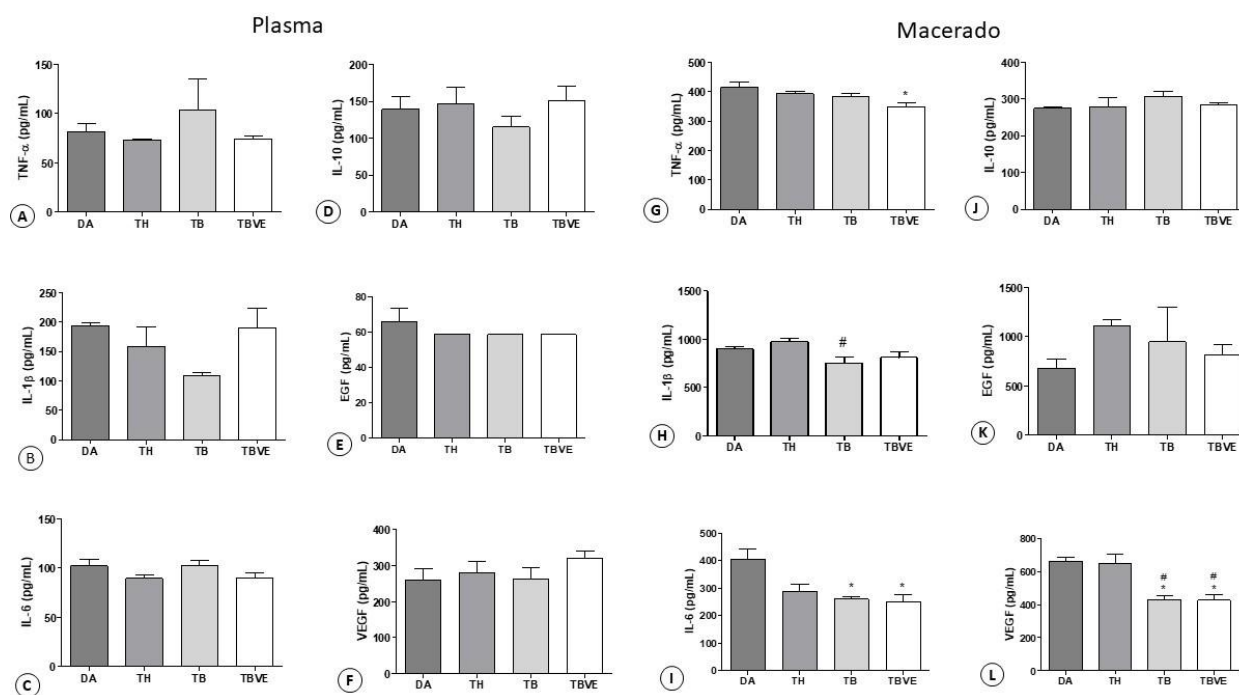
Análises Quantitativas: Resultados apresentados como média $\pm$ S.E.M. (n=5/grupo) (J e K). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs DA.



3.5. Dosagem de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento

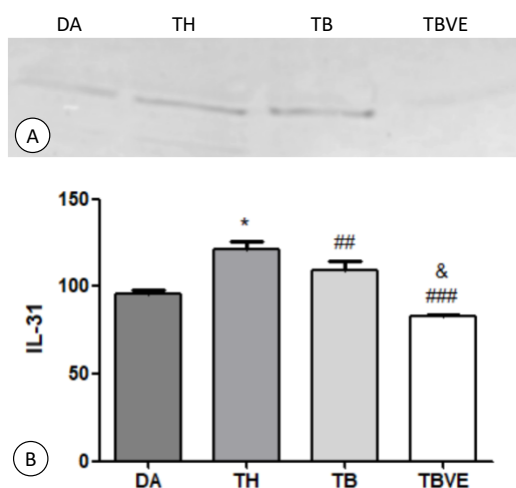
No plasma sanguíneo, não houve alteração significativa entre os grupos relacionadas aos níveis de citocinas (Figura 7A-D) e fatores de crescimento (Figura 7E e F). Contudo, no sobrenadante do macerado das lesões, ocorreu redução ($p < 0,05$) dos níveis de IL-6 (Figura 7I) após os tratamentos com TB e TBVE e TNF- α (Figura 8 G) no grupo TBVE, comparados ao grupo DA. Nos animais tratados com TB também houve redução nos níveis de IL-1 β ($p < 0,05$) em relação ao tratamento padrão (Figura 7H). Além disso, os tratamentos com os biomateriais associados ou não com vesículas extracelulares aumentaram os níveis de VEGF ($p < 0,05$) comparados aos grupos DA e TH (Figura 7L).

Figura 7. Dosagem de citocinas e fatores de crescimento no plasma sanguíneo e no macerado: TNF- α (A e G); IL-1 β (B e H); IL-6 (C e I); IL-10 (D e J), EGF (E e K) e VEGF (F e L). Resultados apresentados como média $\pm$ S.E.M. ($n=5$ /grupo). * $p < 0,05$ vs DA; # $p < 0,05$ vs TH.



A expressão de IL-31 foi analisada por meio de *Western blotting* (Figura 8A) e indicou maior expressão no grupo TH, mas redução pelo tratamento com os biomateriais, especialmente o associado com as VE (Figura 8B).

Figura 8: Análise da expressão de IL-31. *Western blot* representativo (A). Expressões maiores nos grupos TH e TB e baixa expressão no grupo TBVE. Análise densitométrica (B). ** $p < 0,01$ vs DA; ### $p < 0,01$ e ## $p < 0$, vs TH e & $p < 0,05$ vs TB.



4. Discussão

A DA é uma afecção com muitas recidivas, o que estimula a busca por tratamentos mais efetivos. Aqui, investigamos pela primeira vez biomateriais associados a vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente de leite em um modelo DA induzida por acetona e fricção.

Os animais induzidos pela acetona mostraram características clínicas e histopatológicas de rompimento da barreira cutânea semelhantes à DA. Embora na literatura não haja a descrição de modelos de DA que simulem completamente as manifestações clínicas, a maioria deles proporcionam manifestações semelhantes quanto ao fenótipo da doença, mas não são crônicas (Jin et al, 2009). Através da avaliação clínica, o modelo experimental utilizado de fricção com acetona, foi capaz de promover alteração de barreira cutânea, além de sinais de comportamento irritadiço, com lesão hiperemiada, crostosa e pruriginosa e aumento de sensação de coceira. Essas características coincidem com as estabelecidas para a DA e confirmam a validade do modelo. Nos animais tratados com hidrocortisona a 10% e, principalmente, com os biomateriais, associados ou não a vesículas extracelulares, ocorreu a cicatrização das lesões.

Em relação as análises histológicas pela coloração HE, as observações também confirmam os achados macroscópicos, com epiderme rompida, influxo leucocitário, numerosos mastócitos, especialmente degranulados e níveis aumentados de histamina. Contudo, os tratamentos com o biomaterial associado ou não a vesículas extracelulares proporcionou melhor regeneração tecidual, redução do influxo inflamatório e da ativação dos mastócitos. A hiperplasia da epiderme e influxo inflamatório foram também observados em modelo de dermatite atópica induzida por ovoalbumina (OVA) (Parisi et al, 2019). Jin e colaboradores (2009) estudaram camundongos Nc/Nga que têm a capacidade de desenvolver espontaneamente lesões cutâneas semelhantes a DA humana. Como achados, inicialmente, alterações na barreira cutânea, acúmulo de eosinófilos e mastócitos, hiperqueratose epitelial e aumento da resposta de Th2. Já, Tanaka e colaboradores (2012) encontraram características histopatológicas de hiperplasia da epiderme, espongiose e infiltrado de CD4+ e CD8+.

Olivry e colaboradores (2006) avaliaram o potencial inflamatório de cães atópicos através de injeções intradérmicas de *Dermatophagoides farinae* e como resultado, encontraram reação de urticária imediata e inflamação visível e microscópica de longa duração, com reação de fase tardia após exposição antigênica. Grande número de mastócitos em degranulação, indicando a ativação dessas células, também foi observado na DA induzida por ovoalbumina (OVA) (Parisi et al, 2019). Nossos resultados corroboram com os obtidos no estudo de Cho e colaboradores (2018) que utilizaram vesículas extracelulares provenientes de células tronco mesenquimais de tecido adiposo em modelo de DA e observaram redução significativa de mastócitos degranulados em relação aos seus grupos controles ou tratados com prednisolona.

Na sequência dos estudos foi avaliada a expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1. Nossos resultados indicaram forte expressão da AnxA1 nos animais não tratados e com o tratamento padrão e redução após os tratamentos com os biomateriais, especialmente associadas às vesículas extracelulares. No estudo de Parisi e colaboradores (2019) a ausência da AnxA1

exacerbou a resposta antialérgica na DA induzida por ovoalbumina (OVA), aumentando a produção de IgE e IL-17A e o recrutamento e ativação de células inflamatórias, especialmente mastócitos, ao local da lesão. Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, no modelo de queimadura de segundo grau em ratos e tratamento com sulfadiazina de prata a 1%, a expressão de AnxA1 na epiderme e derme, assim como no citoplasma dos mastócitos, varia durante a cicatrização de feridas, sendo fortemente expressa nas fases inflamatória e proliferativa (Souza et al, 2017). Na presente investigação, a aplicação dos biomateriais modulou negativamente a expressão da AnxA1, o que sugere a atuação dos biomateriais independente da ação da AnxA1. Também por imuno-histoquímica, foram quantificadas células positivas para JAK-1 e JAK-3 na derme, possivelmente células inflamatórias. Ainda, a expressão da JAK-1 foi detectada na epiderme, sendo maior nos animais não tratados ou tratados com hidrocortisona a 10% e reduzida pelo tratamento com os biomateriais. Todos os tratamentos, padrão e biomateriais, reduziram o número de células JAK-1 positivas e o tratamento com biomaterial associado às vesículas extracelulares também reduziu a células JAK-3 positivas. Devido a múltiplas famílias de citocinas suprarreguladas da DA, moléculas inibidoras transversalmente envolvidas na transdução de sinal dessas citocinas são conceitualmente atraentes como tratamento. A via JAK-STAT é um regulador mestre da função imune, envolvido na sinalização a jusante de citocinas inflamatórias, incluindo interleucinas, interferons e múltiplos fatores de crescimento. Mutações e polimorfismos dentro desta via JAK-STAT tem implicado em processos autoimunes e malignos (Rodrigues et al, 2020). Assim, a via JAK-STAT é essencial para a função imunológica e hematopoiética, mas também é um dos componentes-chave na patogênese de várias condições imunomediadas, incluindo DA, artrite reumatóide, artrite psoriática e doença inflamatória intestinal. De fato, várias citocinas pró-inflamatórias são capazes de exercer sua função fisiopatológica por meio dessa via de sinalização intracelular. Uma vez ativadas, as JAKs fosforilam o domínio do receptor de citocinas, resultando em um local de encaixe para STATs. O resultado geral da ativação do JAK-STAT é a contribuição tanto para a inflamação da pele da DA quanto para a coceira crônica pela promoção da sinalização pró-inflamatória, envolvendo queratinócitos, neurônios, células da imunidade inata e adquirida (Rodrigues et al, 2020). O recente desenvolvimento de inibidores de JAK-STAT (ou inibidores de JAK), com seus efeitos imunossupressores e antiproliferativos, proporcionou a oportunidade de prevenir a sinalização *downstream* de muitas citocinas. O sucesso na artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias tornou-os importante foco de pesquisa terapêutica para a DA. Eles inibem o componente quinase das JAKs, impedindo-as de fosforilar e interrompendo a transdução da sinalização intracelular. Ao contrário da psoríase ou alopecia areata, em que apenas uma via JAK é regulada positivamente, a DA está associada a um aumento da sinalização através de todas

as quatro JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2), IL-4 e IL-13 que se engajam com o receptor de IL-4 α e a cadeia γ ou o receptor de IL-13 $\alpha 1$ para induzir JAK1 e JAK3, levando à ativação do STAT6. A IL-5 se engaja com o receptor de IL-5 e a cadeia β para induzir JAK1 e JAK2, levando à ativação de STAT1, STAT2 e STAT5. Além disso, estudos recentes demonstraram a ativação da sinalização JAK-STAT na pele lesionada de pacientes com atopia, e que a inibição da sinalização JAK-STAT pode melhorar as dermatites crônicas por melhorar a função de barreira da pele (Campioni et al, 2020).

Na continuidade do estudo foram analisados os níveis de citocinas e fatores de crescimento. Os nossos dados indicaram que os tratamentos com os biomateriais associados ou não às vesículas extracelulares diminuíram os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-31 e TNF- α , bem como do fator de crescimento VEGF. Mesmo que a patogênese da DA ainda não seja completamente clara, muitas evidências sugerem um papel do sistema imunológico na DA. Particularmente, poucos estudos têm sido descritos como uma correlação entre a expressão de TNF- α em termos de mRNA e níveis de proteína na pele da DA. Além disso, os níveis de TNF- α também estão positivamente ligados à gravidade da doença medida pela classificação de Hurley (Van Der Zee et al, 2011).

Níveis elevados de IL-1 β também foram descritos em lesões de DA por Van Der Zee e colaboradores (2011). Essa citocina é um mediador central da resposta inflamatória, promovendo o desenvolvimento de células Th17, já conhecidas por seu papel na psoríase e na DA. Níveis elevados de IL-17 e IL-23 foram relatados na pele lesionada com DA, sugerindo que a ativação do eixo IL-1 β /IL-23/Th17/ também está envolvida na patogênese da doença (Little et al, 2015).

Lee e colaboradores (2020) revelaram que o uso de *Centella asiatica* (CA) inibiu IL-6, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e TNF- α no modelo de DA induzido por dinitroclorobenzeno em camundongo, e que CA inibe mediadores pró-inflamatórios induzidos por IFN- γ e TNF- α , incluindo IL-6 e COX-2 em células HaCaT. Portanto, a CA inibe a expressão de citocinas inflamatórias, que podem efetivamente suprimir os sintomas da DA, como o aumento da espessura epidérmica e dérmica e a infiltração de mastócitos e eosinófilos na derme. Nossa investigação com biomateriais mostrou características anti-inflamatórias similares.

Com relação a IL-31, os tratamentos com biomateriais reduziram a expressão dessa citocina, comparados ao tratamento com hidrocortisona a 10%. A IL-31 é uma citocina Th2 chave na patogênese da DA, sendo definida como potencialmente a principal citocina que causa coceira (Dubin et al., 2021). Pesquisas *in vitro* com queratinócitos de camundongos sugerem envolvimento de IL-31 no recrutamento de células imunes durante o desenvolvimento da DA (Datsi et al., 2020). Ainda, a correlação positiva entre score clínico e DA foi observada em cães

(Chaudhary et al., 2019). Desse modo a redução na expressão da IL-31 promovida pelo tratamento com biomaterial, especialmente associado às vesículas extracelulares, sustenta sua potencialidade terapêutica.

Queratinócitos e possivelmente outras células estromais podem ser uma fonte de fatores angiogênicos durante a cicatrização de feridas e formação de cicatrizes (Genovese et al, 2012). Além disso, há evidências crescentes de que as células inflamatórias que participam da patogênese da DA representam uma fonte significativa de fatores angiogênicos e linfangiogênicos. Genovese e colaboradores (2012) demonstraram que mastócitos humanos primários constitutivamente produzem, além do VEGF-A, VEGF-B angiogênicos, os VEGF-C e VEGF-D linfangiogênicos. Os mastócitos parecem ser não apenas uma fonte de VEGFs na pele, mas também um alvo para esses fatores. De fato, os mastócitos expressam VEGFR-1 e -2, que são os principais receptores para os VEGFs. Além disso, demonstraram que diferentes VEGFs (VEGF-A, -B, -C, -D e PlGF-1) exercem efeitos quimiotáticos em mastócitos ao acoplar ambos os receptores. Uma vez que há evidências de que os mastócitos se acumulam nos locais de angiogênese, é possível que os VEGFs produzidos por mastócitos e outras células residentes exerçam recrutamento parácrino de mastócitos na pele, sustentando assim processos inflamatórios e angiogênicos.

Em modelo murino de DA a progressão da inflamação é concomitante à angiogênese dérmica (Chen et al, 2019). Ainda, os níveis de VEGF são aumentados em pacientes com DA em comparação com a pele normal (Koczy-Baron et al, 2012). Desse modo, a redução de VEGF promovida pelos tratamentos com os biomateriais usados na nossa investigação mostram, uma vez mais, os efeitos benéficos desses tratamentos.

5. Considerações finais

Nossos resultados demonstram que a aplicação de biomateriais, em especial, os associados às vesículas extracelulares derivadas de células tronco da polpa de dente de leite, atenua os sintomas da DA e promove reparação tecidual por meio da regulação das respostas inflamatórias.

Referências Bibliográficas

- Bellini, M. Z.; Caliari-Oliveira, C.; Mizukami, A.; Swiech, K.; Covas, D.T.; Donadi, E.A.; Oliva-Neto, P.; Moraes, A.M. Combining Xanthan And Chitosan Membranes To Multipotent Mesenchymal Stromal Cells As Bioactive Dressings For Dermo-Epidermal Wounds. *Journal Of Biomaterials Applications*. 2015. V. 29, P. 1155-1166.
- Calsavara, E.F.; Endo, P.Y.; Lucas, R. Avaliações Da Ocorrência De Intersecção Entre A

Dermatite Atópica Canina E Outras Dermatopatias Alérgicas. *Nosso Clín.*; 20(118): 12-16, Jul.-Ago. 2017.

Campione E, Lanna C, Diluvio L, Cannizzaro MV, Grelli S, Galluzzo M, Talamonti M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Mancini M, Melino G, Candi E, Schiavone G, Wang Y, Shi Y, Bianchi L. Skin immunity and its dysregulation in atopic dermatitis, hidradenitis suppurativa and vitiligo. *Cell Cycle*. 2020 Feb;19(3):257-267.

Chaudhary SK, Singh SK, Kumari P, Kanwal S, Soman SP, Choudhury S, Garg SK.

Alterations in circulating concentrations of IL-17, IL-31 and total IgE in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2019 Oct;30(5):383-e114.

Chen C, Xu ZQ, Zong YP, Ou BC, Shen XH, Feng H, Zheng MH, Zhao JK, Lu AG. CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF- κ B pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 21;10(3):178.

Cho BS, Kim JO, Ha DH, Yi YW. Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Jul 11;9(1):187.

Cosgrove, S.B.; Cleaver, D.M.; King, V.L.; Gilmer, A.R.; Daniels, A.E.; Wren, J.A.; Stegemann, M.R. Long-Term Compassionate Use Of Oclacitinib In Dogs With Atopic And Allergic Skin Disease: Safety, Efficacy And Quality Of Life. *Vet. Dermatol*. 2015, 26, 171-E35.

Datsi A, Steinhoff M, Ahmad F, Alam M, Buddenkotte J. Interleukin-31: The "itchy" cytokine in inflammation and therapy. *Allergy*. 2021 Oct;76(10):2982-2997.

Deboer DJ. The Future Of Immunotherapy For Canine Atopic Dermatitis: A Review. *Vet Dermatol*. 2017 Feb;28(1):25-E6.

Deboer, D. J.; Medical Treatment Of Pruritus And Atopic Dermatites. *Vetfolio*. 2010. Disponível Em: [Http://Www.Vetfolio.Com/2014-Aaha-Conference-Recordings/Medical-Treatment-Of-Pruritus-And-Atopic-Dermatitis](http://Www.Vetfolio.Com/2014-Aaha-Conference-Recordings/Medical-Treatment-Of-Pruritus-And-Atopic-Dermatitis).

Dostert, G., Mesure, B., Menu, P. And Velot, É. How Do Mesenchymal Stem Cells Influence Or Are Influenced By Microenvironment Through Extracellular Vesicles Communication? *Frontiers In Cell And Developmental Biology*. 2017. 5, P.6.

Dubin C, Del Duca E, Guttman-Yassky E. The IL-4, IL-13 and IL-31 pathways in atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2021 Aug;17(8):835-852.

Fatima, F., Ekstrom, K., Nazarenko, I., Maugeri, M., Valadi, H., Hill, A.F., Camussi, G. And Nawaz, M. Non-Coding Rnas In Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Deciphering Regulatory Roles In Stem Cell Potency, Inflammatory Resolve, And Tissue Regeneration. *Frontiers In Genetics*. 2017. 8, P.161.

Ferreira, J.R.M.; Bumachar, B.S.A.; Serafim, A.J.; Navarro Da Rocha, D.; Marçal R.L.S.B.; Bueno, D.F.; Pinheiro, C.C.G.; Barbosa, R.M.; BR102019005811A2 (Pt), 2019-03-25, 2020-10-13, Processo De Obtenção De Fatores Indutivos Para Uso Na Regeneração Tecidual Óssea.

Genovese A, Detoraki A, Granata F, Galdiero MR, Spadaro G, Marone G. Angiogenesis, lymphangiogenesis and atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy*. 2012;96:50-60.

Gobbetti T, Cooray SN. Annexin A1 And Resolution Of Inflammation: Tissue Repairing Properties And Signalling Signature. *Biol Chem*. 2016 Oct 1;397(10):981-93.

Jassies-Van Der Lee, A. *T Cells And Immunomodulation In Canine Atopic Dermatitis*; Utrecht University: Utrecht, The Netherlands, 2014.

Jin L, Fang W. On "A comment on 'Prediction of protein structural classes by a new measure of information discrepancy'". *Comput Biol Chem*. 2009 Dec;33(6):469-70.

Kim J, Ahn K. Atopic Dermatitis Endotypes: Knowledge For Personalized Medicine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2022 Jun 1;22(3):153-159.

Koczy-Baron E, Jochem J, Kasperska-Zajac A. Increased plasma concentration of vascular endothelial growth factor in patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and platelet activation. *Inflamm Res*. 2012 Dec;61(12):1405-9.

Lee HJ, Hong YJ, Kim M. Angiogenesis In Chronic Inflammatory Skin Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 7;22(21):12035.

Little, P. R.; King, V. L.; Davis, K. R.; Cosgrove, S. B.; Stegemann, M. R. A Blinded, Randomized Clinical Trial Comparing The Efficacy And Safety Of Oclacitinib And Ciclosporin For The Control Of Atopic Dermatitis In Client-Owned Dogs. Austrália, *Vet Dermatol*, 2015 - 26: 23–E8.

Marsella, R. Atopic Dermatitis In Domestic Animals: What Our Current Understanding Is And How This Applies To Clinical Practice. *Vet. Sci*. 2021, 8, 124.

Neves, J. G., Da Rocha, D. N., Lopes, C. C., Barbosa, R. M., Ferreira, L. F., Westin, C. B., Moraes, A.M., Calsa, B., Santamaria-Jr, M., Correr-Sobrinho, L.& Correr, A. B. (2022). Calcium Phosphates Chitosan-Xanthan Composite Scaffolds Associated With Mesenchymal Stem Cells For Regenerative Dentistry Application. *Ceramics International*.

Neves, J. G., Navarro Da Rocha, D., Lopes, C. C., Prado Da Silva, M. H., Sinhoreti, M. A. C., Correr-Sobrinho, L., Fraga, M.A.A. & Correr, A. B. (2021). Effect Of Ph Level And Calcination On The Production Of Calcium Phosphates By Acidic Route Of Wet.

Nezamololama N, Fieldhouse K, Metzger K, Gooderham M. Emerging Systemic JAK Inhibitors In The Treatment Of Atopic Dermatitis: A Review Of Abrocitinib, Baricitinib, And Upadacitinib. *Drugs Context*. 2020 Nov 16;9:2020-8-5.

Nuttall T, Uri M, Halliwell R. Canine Atopic Dermatitis - What Have We Learned? *Vet Rec.* 2013 Feb 23;172(8):201-7.

Okawa T, Yamaguchi Y, Takada S, Sakai Y, Numata N, Nakamura F, Nagashima Y, Ikezawa Z, Aihara M. Oral administration of collagen tripeptide improves dryness and pruritus in the acetone-induced dry skin model. *Journal of Dermatological Science.* 2012. 136-143.

Olivry T, Deboer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélard P; International Task Force On Canine Atopic Dermatitis. Treatment Of Canine Atopic Dermatitis: 2010 Clinical Practice Guidelines From The International Task Force On Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol.* 2010 Jun;21(3):233-48.

Olivry, T. What's New For Treatment Of Canine Atopic Dermatitis?. NC State University College Of Veterinary Medicine Raleigh, North Carolina, USA. *Francevet.Com.* 2017. Disponível Em: [Http://Www.Francevet.Com/Programme-France-Vet-2017-16-Mars-2017/Actualite%20A9s-Dans-Le-Traitement-De-La-Dermatite-Atopique-Canine](http://Www.Francevet.Com/Programme-France-Vet-2017-16-Mars-2017/Actualite%20A9s-Dans-Le-Traitement-De-La-Dermatite-Atopique-Canine).

Parisi JDS, Corrêa MP, Gil CD. Lack Of Endogenous Annexin A1 Increases Mast Cell Activation And Exacerbates Experimental Atopic Dermatitis. *Cells.* 2019 Jan 15;8(1):51.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. And Marshak, D.R. Multilineage Potential Of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.*1999. 284(5411), Pp.143-147.

Pucheu-Haston, C.M. Atopic Dermatitis In The Domestic Dog. *Clin. Dermatol.* 2016, 34, 299– 303.

Rodrigues MA, Torres T. JAK/STAT inhibitors for the treatment of atopic dermatitis. *J Dermatolog Treat.* 2020 Feb;31(1):33-40.

Roesner, L.M.; Werfel, T.; Heratizadeh, A. The Adaptive Immune System In Atopic Dermatitis And Implications On Therapy. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2016, 12, 787–796.

Schlotter, Y.M.; Rutten, V.P.; Riemers, F.M.; Knol, E.F.; Willemse, T. Lesional Skin In AtopicDogs Shows A Mixed Type-1 And Type-2 Immune Responsiveness. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011, 143, 20–26.

Souza, A. P., Neves, J. G., Da Rocha, D. N., Lopes, C. C., Moraes, Â. M., Correr-Sobrinho, L., & Correr, A. B. (2022). Chitosan/Xanthan Membrane Containing Hydroxyapatite/Graphene Oxide Nanocomposite For Guided Bone Regeneration. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 136, 105464.

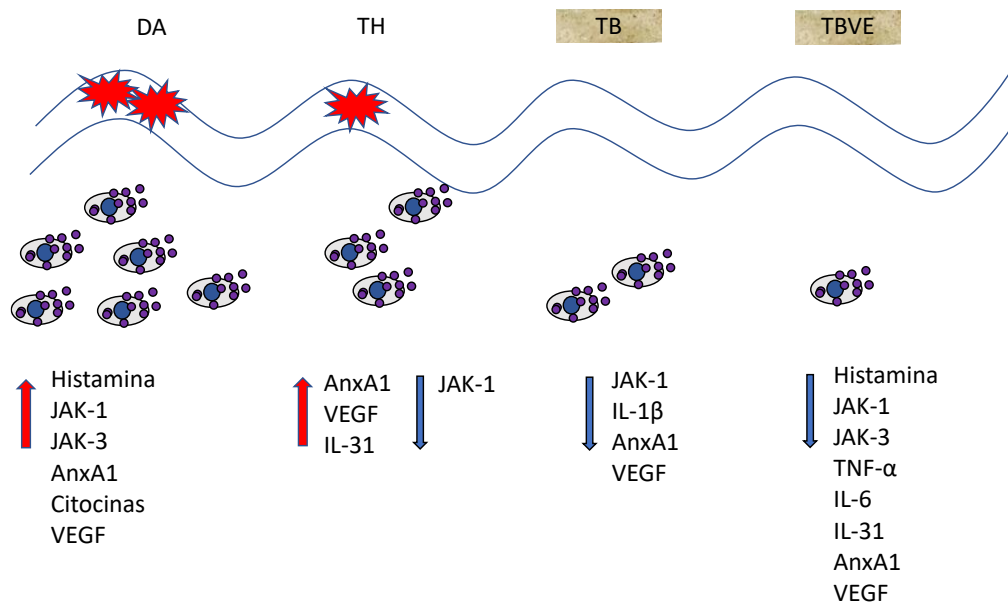
Van Der Zee HH, De Ruiter L, Van Den Broecke DG, et al. Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: A rationale for targeting TNF- α and IL-1 β . *Br J Dermatol.* 2011;164:1292–1298.

4. CONCLUSÕES

- Pelas análises clínicas e macroscópicas, a presença de hiperemia, edema, hiperplasia da epiderme e prurido caracterizaram o modelo de DA. Essas características foram atenuadas com os tratamentos.
- Os tratamentos propostos, por meio das análises histopatológicas, indicaram regeneração tecidual, redução do infiltrado inflamatório e diminuição dos mastócitos, principalmente degranulados.
- Os níveis de histamina plasmática foram reduzidos nos animais tratados com biomaterial associado às vesículas extracelulares.
- A expressão da AnxA1 na epiderme foi menor nos grupos tratados com biomaterial, especialmente quando associados às vesículas extracelulares.
- Os tratamentos com biomaterial reduziram a expressão de JAK-1 na epiderme.
- Todos os tratamentos diminuíram as células positivas para JAK-1 e na presença de vesículas extracelulares também foram reduzidas as células JAK-3 positivas.
- Os níveis de IL-6 foram reduzidos após tratamentos com os biomateriais. A associação com vesículas extracelulares também diminuiu o TNF- α , enquanto a IL-1 β foi reduzida no grupo biomaterial sem vesículas extracelulares.
- Níveis reduzidos de VEGF, com relação ao grupo não tratado e padrão, ocorreram após tratamentos com ambas os biomateriais.
- A expressão de IL-31 foi reduzida nos animais tratados com o biomaterial associado às vesículas extracelulares com relação ao tratamento padrão.

Em conjunto nossos dados mostram a potencialidade do uso de biomaterial composto por hidroxiapatita, quitosana e vesículas extracelulares provenientes de células tronco de polpa de dente de leite, como nova estratégia terapêutica na DA (Figura 3)

Figura 3: Modelo esquemático da modulação da inflamação no modelo de DA e tratamentos com biomateriais. A aplicação da acetona com fricção promoveu o rompimento da barreira cutânea, ativou os mastócitos e a liberação de vários mediadores químicos. Os tratamentos reduziram esses mediadores e levaram a regeneração tecidual, com melhores respostas aos tratamentos com biomateriais.



5. REFERÊNCIAS

- AL-SHAIBANI, M.B.H; WANG, X; LOVAT, P.E; DICKINSON, M. Cellular therapy for wounds: applications of mesenchymal stem cells in wound healing. In: *New Insights Into Ancient Challenges*. Intechopen, 2016.
- ASAHINA, R.; NISHIDA, H.; KAMISHINA, H.; MAEDA, S. Expression of il-33 in chronic lesional skin of canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2018, 29, 246-E91.
- ASAHINA, R.; UEDA, K.; OSHIMA, Y.; KANEI, T.; KATO, M.; FURUE, M.; TSUKUI, T.; NAGATA, M.; MAEDA, S. Serum canine thymus and activation-regulated chemokine (tarc/ccl17) concentrations correlate with disease severity and therapeutic responses in dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2020, 31, 446–455.
- BARBOSA, R.M. incorporação de hidroxipatita em matrizes de quitosana e xantana e liberação de doxiciclina em membranas aplicáveis na regeneração tecidual e terapia avançada. Recurso Online (119 P.). Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual De Campinas, Faculdade De Engenharia Química, Campinas, SP. 2019.
- BARCELOS, R.C., SAMPAYO, C.D., ANTONIAZZI, C.T., SEGAT, H.J., SILVA, H.M., BURGER, M.E., LIMA, B.D., & RODRIGUES, L.M. 2014. Modelo tipo de dermatite atópica em rato.
- BELLINI, M. Z.; CALIARI-OLIVEIRA, C.; MIZUKAMI, A.; SWIECH, K.; COVAS, D.T.; DONADI, E.A.; OLIVA-NETO, P.; MORAES, A.M. combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *Journal Of Biomaterials Applications*. 2015. V. 29, P. 1155-1166.
- BIERHALZ, A.C.; MORAES, A.M. tuning the properties of alginate—chitosan membranes by varying the viscosity and the proportions of polymers. *Journal Of Applied Polymer Science*. 2016. 133(46).
- BLASKOVIC S, ADIBEKIAN A, BLANC M, VAN DER GOOT G.F. mechanistic effects of protein palmitoylation and the cellular consequences thereof. *Chem phys lipids*. 2014 May;180:44-52.
- CABANILLAS B, NOVAK N. Atopic dermatitis and filaggrin. *Curr Opin Immunol*. 2016 Oct;42:1-8.
- CALSAVARA, E.F.; ENDO, P.Y.; LUCAS, R. Avaliações da ocorrência de intersecção entre a dermatite atópica canina e outras dermatopatias alérgicas. *Nosso Clín.*; 20(118): 12-16, Jul.-Ago. 2017.
- COBIELLA D, GRAM D, SANTORO D. Isolation of neisseria dumasiana from a deep bite wound infection in a dog. *Vet Dermatol*. 2019 Dec;30(6):556-E168.
- COMBARROS D, CADIERGUES M.C, SIMON M. Update on canine filaggrin: a review. *Vet Q*. 2020 Dec;40(1):162-168.
- CORNELISSEN C, LÜSCHER-FIRZLAFF J, BARON J.M, LÜSCHER B. Signaling by il-31 and functional consequences. *Eur J Cell Biol*. 2012 Jun-Jul;91(6-7):552-66.
- COSGROVE, S.B.; CLEAVER, D.M.; KING, V.L.; GILMER, A.R.; DANIELS, A.E.; WREN, J.A.; STEGEMANN, M.R. long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. *Vet. Dermatol.* 2015, 26, 171-E35.
- CZARNOWICKI T, HE H, KRUEGER J.G, GUTTMAN-YASSKY E. Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Jan;143(1):1-11.
- DE MENDONÇA COSTA, A., BUENO, D.F., MARTINS, M.T., KERKIS, I., KERKIS, A., FANGANIELLO, R.D., CERRUTI, H., ALONSO, N. AND PASSOS-BUENO, M.R. reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *Journal Of Craniofacial Surgery*. 2008.19(1), Pp.204-210.
- DEBOER D.J. the future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. *Vet*

Dermatol. 2017 Feb;28(1):25-E6.

DEBOER, D.J. Medical treatment of pruritus and atopic dermatitis. Vetfolio. 2010. Disponível Em: [Http://Www.Vetfolio.Com/2014-Aaha-Conference-Recordings/Medical-Treatment-Of-Pruritus-And-Atopic-Dermatitis](http://Www.Vetfolio.Com/2014-Aaha-Conference-Recordings/Medical-Treatment-Of-Pruritus-And-Atopic-Dermatitis).

DING, Y.; SHAO, X.; LI, X.; ZHAI, Y.; ZHANG, Y.; WANG, S.; FANG, H. Identification of candidate genes in atopic dermatitis based on bioinformatic methods. Int. J. Dermatol. 2016, 55, 791– 800.

DOMINICI, M. L. B. K.; LE BLANC, K; MUELLER, I; SLAPER-CORTENBACH, F. C; MARINI, D. S; KRAUSE, R. J; DEANS, A; KEATING, D. J. PROCKOP AND HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society For Cellular Therapy Position Statement." Cytotherapy 8, No. 4 (2006): 315-317.

DOSTERT, G., MESURE, B., MENU, P. AND VELOT, É. How do mesenchymal stem cells influence or are influenced by microenvironment through extracellular vesicles communication? Frontiers In Cell And Developmental Biology. 2017. 5, P.6.

DRISLANE C, IRVINE A.D. The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease. Ann Allergy Asthma Immunol. 2020 Jan;124(1):36-43.

FATIMA, F., EKSTROM, K., NAZARENKO, I., MAUGERI, M., VALADI, H., HILL, A.F., CAMUSSI, G. AND NAWAZ, M. Non-coding rnas in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: deciphering regulatory roles in stem cell potency, inflammatory resolve, and tissue regeneration. Frontiers In Genetics. 2017. 8, P.161.

FERREIRA, J.R.M.; BUMACHAR, B.S.A.; SERAFIM, A.J.; NAVARRO DA ROCHA, D.; MARÇAL R.L.S.B.; BUENO, D.F.; PINHEIRO, C.C.G.; BARBOSA, R.M. BR102019005811A2 (Pt), 2019-03-25, 2020-10-13, processo de obtenção de fatores indutivos para uso na regeneração tecidual óssea.

FLOHR C, YEO L. Atopic dermatitis and the hygiene hypothesis revisited. Curr Probl Dermatol. 2011;41:1-34.

GOBBETTI T, COORAY S.N. annexin a1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. Biol Chem. 2016 Oct 1;397(10):981-93.

GONZALES A.J, HUMPHREY W.R, MESSAMORE J.E, FLECK T.J, FICI G.J, SHELLY J.A, TEEL J.F, BMMERT G.F, DUNHAM S.A, FULLER T.E, MCCALL R.B. interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. Vet Dermatol. 2013 Feb;24(1):48-53.E11-2.

GOW, D.J.; JACKSON, H.; FORSYTHE, P.; NUTTALL, T.; GOW, A.G.; MELLANBY, R.J.; HUME, D.A. Measurement of serum interleukin 34 (il-34) and correlation with severity and pruritus scores in client-owned dogs with atopic dermatitis. Vet. Dermatol. 2020, 31, 359.

HENSEL P, SANTORO D, FAVROT C, HILL P, GRIFFIN C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. BMC Vet Res. 2015 Aug 11;11:196.

HNILICA, K. A. Dermatologia de pequenos animais atlas colorido e guia terapêutico. 3a Edição. Rio De Janeiro: Elsevier, 2012.

HSIAO C, MARANDA E.L, ESTES W.A, SOZA G.M, NOURI K. Dermatology and possession. JAMA Dermatol. 2016 Sep 1;152(9):1034.

JASSIES-VAN DER LEE, A. T cells and immunomodulation in canine atopic dermatitis. Utrecht University: Utrecht, The Netherlands, 2014.

JEFFERS J.G. Topical therapy for drug-resistant pyoderma in small animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2013 Jan;43(1):41-50.

KARGOZAR, S., MOZAFARI, M., HAMZEHLLOU, S. AND BAINO, F. Using bioactive glasses in the management of burns. Frontiers In Bioengineering And Biotechnology, 7, 2019.Lopes, C. C., PINHEIRO, W. A., DA ROCHA, D. N., NEVES, J. G., CORRER, A. B., FERREIRA, J. R., BARBOSA, R. M., SOARES, J.R.F., SANTOS, J.L. & DA SILVA, M. H. P. (2021). Nanocomposite powders of hydroxyapatite-graphene oxide for biological applications. Ceramics International, 47(6), 7653-7665.

KIM J, AHN K. Atopic dermatitis endotypes: knowledge for personalized medicine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2022 Jun 1;22(3):153-159.

KLUKOWSKA-RÖTZLER, J.; CHERVET, L.; MÜLLER, E.J.; ROOSJE, P.; MARTI, E.; JANDA, J. Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol*. 2013, 24, 54-E14.

KVAC M, MYSKOVA E, HOLUBOVA N, KELLNEROVA K, KICIA M, RAJSKY D, MCEVOY J, FENG Y, HANZAL V, SAK B. Occurrence and genetic diversity of cryptosporidium spp. In wild foxes, wolves, jackals, and bears in central europe. *Folia Parasitol (Praha)*. 2021 Feb 2;68:2021.002.

LEE H.J, HONG Y.J, KIM M. Angiogenesis in chronic inflammatory skin disorders. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 7;22(21):12035.

LITTLE, P. R.; KING, V. L.; DAVIS, K. R.; COSGROVE, S. B.; STEGEMANN, M. R. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. *Austrália, Vet Dermatol*, 2015 - 26: 23–E8.

MARSELLA, R. Atopic dermatitis in domestic animals: what our current understanding is and how this applies to clinical practice. *Vet. Sci*. 2021, 8, 124.

MINESHIGE, T.; KAMIIE, J.; SUGAHARA, G.; SHIROTA, K. A study on periostin involvement in the pathophysiology of canine atopic skin. *J. Vet. Med. Sci*. 2018, 80, 103–111.

MISHRA, S.K.; WHEELER, J.J.; PITAKE, S.; DING, H.; JIANG, C.; FUKUYAMA, T.; PAPS, J.S.; RALPH, P.; COYNE, J.; PARKINGTON, M.; et al. Periostin activation of integrin receptors on sensory neurons induces allergic itch. *Cell Rep*. 2020, 31, 107472.

MOYAERT H, MORRISSEY I, DE JONG A, EL GARCH F, KLEIN U, LUDWIG C, THIRY J, YOUALA M. Antimicrobial susceptibility monitoring of bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in dogs and cats across europe: compath results. *Microb Drug Resist*. 2017 Apr;23(3):391-403.

MUELLER R.S. Update on allergen immunotherapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2019 Jan;49(1):1-7.

NEVES, J. G., DA ROCHA, D. N., LOPES, C. C., BARBOSA, R. M., FERREIRA, L. F., WESTIN, C. B., MORAES, A.M., CALSA, B., SANTAMARIA-JR, M., CORRER-SOBRINHO, L.& CORRER, A. B. (2022). Calcium phosphates chitosan-xanthan composite scaffolds associated with mesenchymal stem cells for regenerative dentistry application. *Ceramics International*.

NEVES, J. G., NAVARRO DA ROCHA, D., LOPES, C. C., PRADO DA SILVA, M. H., SINHORETI, M. A. C., CORRER-SOBRINHO, L., FRAGA, M.A.A. & CORRER, A. B. (2021). Effect of ph level and calcination on the production of calcium phosphates by acidic route of wet.

NEZAMOLOLAMA N, FIELDHOUSE K, METZGER K, GOODERHAM M. Emerging systemic jak inhibitors in the treatment of atopic dermatitis: a review of abrocitinib, baricitinib, and upadacitinib. *Drugs Context*. 2020 Nov 16;9:2020-8-5.

NUTTALL T, URI M, HALLIWELL R. Canine atopic dermatitis - what have we learned? *Vet Rec*. 2013 Feb 23;172(8):201-7.

OLIVRY T, DEBOER D.J, FAVROT C, JACKSON H.A, MUELLER R.S, NUTTALL T, PRÉLAUD P. International task force on canine atopic dermatitis. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the international task force on canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2010 Jun;21(3):233-48.

OLIVRY, T. What's new for treatment of canine atopic dermatitis? NC State University College Of Veterinary Medicine Raleigh, North Carolina, USA. *Francevet.Com*. 2017. Disponível Em: [Http://Www.Francevet.Com/Programme-France-Vet-2017-16-Mars-2017/Actualite%C3%A9s-Dans-Le-Traitement-De-La-Dermatite-Atopique-Canine](http://Www.Francevet.Com/Programme-France-Vet-2017-16-Mars-2017/Actualite%C3%A9s-Dans-Le-Traitement-De-La-Dermatite-Atopique-Canine).

PARISI J.D.S, CORRÊA M.P, GIL C.D. lack of endogenous annexin a1 increases mast cell

activation and exacerbates experimental atopic dermatitis. *Cells*. 2019 Jan 15;8(1):51.

PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C., JAISWAL, R.K., DOUGLAS, R., MOSCA, J.D., MOORMAN, M.A., SIMONETTI, D.W., CRAIG, S. AND MARSHAK, D.R. multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*.1999. 284(5411), Pp.143-147.

PRÉLAUD, P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the international task force on canine atopic dermatitis. France. *Veterinary Dermatology*, 2010 - 21: 233–248.

PROKSCH E. Ph in nature, humans and skin. *J Dermatol*. 2018 Sep;45(9):1044-1052.

PUCHEU-HASTON, C.M. Atopic dermatitis in the domestic dog. *Clin. Dermatol*. 2016, 34, 299– 303.

RHODES, K. H., WERNER, A. H. *Dermatologia em pequenos animais*. 2a Edição. São Paulo: Rocca, 2014.

RODUIT C, FREI R, DEPNER M, KARVONEN A.M, RENZ H, BRAUN-FAHRLÄNDER C, SCHMAUSSER-HECHFELLNER E, PEKKANEN J, RIEDLER J, DALPHIN J.C, VON MUTIUS E, LAUENER R.P. THE PASTURE STUDY GROUP, HYVÄRINEN A, KIRJAVAINEN P, REMES S, ROPONEN M, DALPHIN M.L, KAULEK V, EGE M, GENUNEIT J, ILLI S, KABESCH M, SCHAUB B, PFEFFERLE P.I, DOEKES G. Phenotypes of Atopic Dermatitis Depending on the Timing of Onset and Progression in Childhood. *JAMA Pediatr*. 2017 Jul 1;171(7):655-662.

ROESNER, L.M.; WERFEL, T.; HERATIZADEH, A. The adaptive immune system in atopic dermatitis and implications on therapy. *Expert Rev. Clin. Immunol*. 2016, 12, 787–796.

RUTKOWSKI K, SOWA P, RUTKOWSKA-TALIPSKA J, KURLISZYN-MOSKAL A, RUTKOWSKI R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes. *Drugs*. 2014 Jul;74(11):1195-207.

SARIDOMICHELAKIS M.N, OLIVRY T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J*. 2016 Jan;207:29-37.

SCHLOTTER, Y.M.; Rutten, V.P.; Riemers, F.M.; Knol, E.F.; Willemse, T. Lesional Skin In Atopic Dogs Shows A Mixed Type-1 And Type-2 Immune Responsiveness. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2011, 143, 20–26.

SECCO, M., ZUCCONI, E., VIEIRA, N.M., FOGAÇA, L.L., CERQUEIRA, A., CARVALHO, M.D.F., JAZEDJE, T., OKAMOTO, O.K., MUOTRI, A.R. AND ZATZ, M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008. 26(1), Pp.146-150.

SOUZA, A. P., NEVES, J. G., DA ROCHA, D. N., LOPES, C. C., MORAES, Â. M., CORRER-SOBRINHO, L., & CORRER, A. B. (2022). Chitosan/xanthan membrane containing hydroxyapatite/graphene oxide nanocomposite for guided bone regeneration. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 136, 105464.

TAMAMOTO-MOCHIZUKI C, PAPS J.S, OLIVRY T. Proactive maintenance therapy of canine atopic dermatitis with the anti-il-31 lokivetmab. Can a monoclonal antibody blocking a single cytokine prevent allergy flares? *Vet Dermatol*. 2019 Jan 23.

WEIDINGER S, BECK L.A, BIEBER T, KABASHIMA K, IRVINE A.D. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Jun 21;4(1):1.

WHITE A.G, SANTORO D, AHRENS K, MARSELLA R. Single blinded, randomized, placebo-controlled study on the effects of ciclosporin on cutaneous barrier function and immunological response in atopic beagles. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018.

WOLLENBERG A, BECK L.A, BLAUVELT A, SIMPSON E.L, CHEN Z, CHEN Q, SHUMEL B, KHOKHAR F.A, HULTSCH T, RIZOVA E, ROSSI A.B, GRAHAM N.M.H, PIROZZI G, LU Y, ARDELEANU M. Laboratory safety of dupilumab in moderate-to-severe atopic dermatitis: results from three phase iii trials (LIBERTY AD SOLO 1, LIBERTY AD SOLO 2, LIBERTY AD CHRONOS). *Br J Dermatol*. 2020 May;182(5):1120-1135.

ZUK, P.A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D.A., HUANG, J.I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z.C., FRASER, J.K., BENHAÏM, P. AND HEDRICK, M.H. human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology Of The Cell*. 2002. 13(12), Pp.4279-4295.

ANEXO – Aprovação CEUA



CENTRO UNIVERSITÁRIO PADRE ALBINO
MANTIDO PELA FUNDAÇÃO PADRE ALBINO
Rua dos Estudantes, 225 - CEP 15809-144 - Catanduva-SP
www.unifipa.com.br



C E R T I F I C A D O

Nº 02/21

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito da associação de biomateriais e vesículas celulares na reparação tecidual em modelo de dermatite atópica”, registrada com o **Número 02/21**, sob a responsabilidade de **Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula Girol** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Centro Universitário Padre Albino – UNIFIPA, em reunião de 10/02/2021.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/02/2021 a 31/12/2022
Espécie/ Linhagem/ Raça	<i>Rattus norvegicus/ Wistar</i>
Nº de animais	14
Peso/Idade	200-300g
Sexo	Machos
Origem	Biotério UNIFIPA

Catanduva (SP), 10 de Fevereiro de 2021.

Prof.ª. Dr.ª. Andréia de Haro Moreno
Coordenadora da CEUA-UNIFIPA

CEUA – UNIFIPA

Fone: (17) 3311-3340 – e-mail: ceua@unifipa.com.br