

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

# NATHALIA DE CARVALHO INDOLFO

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS METODOLÓGICAS COM APLICAÇÃO DE SISTEMAS MICROFISIOLÓGICOS E TOXICOGENÔMICA PARA AVALIAÇÃO DE DESFECHOS TOXICOLÓGICOS EM COSMÉTICOS

DEVELOPMENT OF NEW APPROACH METHODOLOGIES WITH APPLICATION OF MICROPHYSIOLOGICAL SYSTEMS AND TOXICOGENOMICS TO ASSESS TOXICOLOGICAL ENDPOINTS IN COSMETICS

> CAMPINAS 2024

## NATHALIA DE CARVALHO INDOLFO

# DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS METODOLÓGICAS COM APLICAÇÃO DE SISTEMAS MICROFISIOLÓGICOS E TOXICOGENÔMICA PARA AVALIAÇÃO DE DESFECHOS TOXICOLÓGICOS EM COSMÉTICOS

# DEVELOPMENT OF NEW APPROACH METHODOLOGIES WITH APPLICATION OF MICROPHYSIOLOGICAL SYSTEMS AND TOXICOGENOMICS TO ASSESS TOXICOLOGICAL ENDPOINTS IN COSMETICS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Migliorini Figueira

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA NATHALIA DE CARVALHO INDOLFO, ORIENTADA PELA DRª ANA CAROLINA MIGLIORINI FIGUEIRA.

> CAMPINAS 2024

#### Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Indolfo, Nathalia de Carvalho, 1990-

In27d Desenvolvimento de novas abordagens metodológicas com aplicação de sistemas microfisiológicos e toxicogenômica para avaliação de desfechos toxicológicos em cosméticos / Nathalia de Carvalho Indolfo. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

> Orientador: Ana Carolina Migliorini Figueira. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Cosméticos - Toxicologia. I. Figueira, Ana Carolina Migliorini, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

#### Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Development of new approach methodologies with application of microphysiological systems and toxicogenomics to assess toxicological endpoints in cosmetics

Palavras-chave em inglês: Cosmetics, Toxicology Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde Titulação: Doutora em Ciências Banca examinadora: Ana Carolina Migliorini Figueira [Orientador] Izabel Vianna Villela Marize Campos Valadares Gustavo Facchini Artur Christian Garcia da Silva Data de defesa: 18-01-2024 Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-2379-3579
 Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/6966210480881399



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Autora Nathalia de Carvalho Indolfo Orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Migliorini Figueira

Tese aprovada em 18 de janeiro de 2024

# Comissão examinadora:

Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Migliorini Figueira Dr<sup>a</sup> Izabel Vianna Villela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marize Campos Valadares Dr. Gustavo Facchini Prof. Dr. Artur Christian Garcia da Silva

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Campinas, 18 de janeiro de 2024

Dedico essa tese aos meus pais, Isabel e Richard, fonte de amor incondicional, e que me deram todas as oportunidades para que eu chegasse até aqui.

#### AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra Ana Carolina Figueira, pelas oportunidades e ensinamentos durante tantos anos de mestrado e o doutorado.

A Fabi, grande amiga e inspiração que a Natura me deu. Agradeço por tanto! Pela amizade, por tantas portas que me ajudou a abrir, pelo apoio a realizar o doutorado desde o início do projeto Naturalis, por confiar a mim o pilar in vitro do projeto, acreditar que eu seria capaz de conciliar o trabalho em dose dupla (Natura + pós-graduação) e por me incentivar sempre.

Ao time do projeto Naturalis: Mel, Tablits e May, amigas do coração, que me ajudaram tanto no decorrer deste trabalho, seja na bancada do laboratório, nas reuniões do projeto ou nas inúmeras conversas, recheadas de desabafos e risadas.

Às minhas gestoras Bianca Rocha e Cristiane Calvo, por todas as oportunidades e incentivo que me dão e por permitirem a realização do meu doutorado em paralelo às atividades da Natura.

À Talita Marin, que me inseriu no mundo dos métodos alternativos ao uso de animais e por quem sempre terei muita gratidão por todas as oportunidades e ensinamentos que me deu.

Ao meu amigo Marcelo Vieira, que me aproximou ainda mais da temática de métodos alternativos, por todo o conhecimento compartilhado e incentivo.

Ao time da GSP da Natura, em especial às Sandrinhas por serem as melhores parceiras de trabalho que eu poderia ter. Obrigada pela amizade e por todo o apoio durante o doutorado.

Aos colaboradores do CNPEM, em especial às meninas do LNBio Thayná e Larissa, que contribuíram para que o nosso artigo ficasse ainda mais robusto e completo.

À Natura e ao LNBio, por toda a infraestrutura disponibilizada e investimento para a realização deste trabalho. À Embrapii pelo co-financiamento do projeto.

Às minhas amigas, que sempre me apoiaram tanto na realização deste trabalho.

À minha família, pelo apoio, por todo o amor compartilhado e por sempre acreditarem no meu potencial. Em especial, aos meus pais Isabel e Richard, que me deram todas as melhores oportunidades na vida, e à minha irmã e melhor amiga Maria Beatriz, por ser meu ombro amigo e sempre me incentivar e confortar nos momentos que mais preciso.

À minha avó Malu e à minha segunda-mãe Tina, por serem as melhores pessoas que conheço e por todo o amor e dedicação às nossas famílias.

Aos meus avós, Mário e Ruth, por terem me ensinado tanto quando criança, instigado em mim a vontade de estudar mais e mais e deixado ensinamentos e memórias maravilhosos.

Aos meus sogros, Rosa e Jair, por todo o apoio e incentivo a ser uma doutora!

Ao meu noivo, Giuliano, que me acompanhou durante todo este trabalho, sempre me apoiando em todas as noites e finais de semana dedicados ao artigo e à tese. Obrigada por sempre enxergar o melhor de mim, me apoiar e me dar a certeza de que quero compartilhar a vida com você para sempre.

"A ciência e a vida cotidiana não podem - e não devem - ser separadas. A ciência fornece uma explicação parcial sobre a vida mas, até onde consegue chegar, é baseada em fatos, experiências e experimentos." Rosalind Franklin

#### RESUMO

O banimento de testes em animais para ingredientes e produtos cosméticos já é uma realidade na Europa e vem ganhando força de lei em diversas localidades no mundo. Os consumidores têm acesso livre aos produtos cosméticos comercializados e, desta forma, a segurança destes produtos deve ser garantida. A segurança de cosméticos se baseia na segurança de cada ingrediente presente nas formulações. Sendo assim, metodologias robustas e confiáveis devem ser utilizadas para avaliar os perigos que cada ingrediente oferece. Atualmente, já estão disponíveis metodologias que não utilizam animais para avaliar diversos desfechos toxicológicos. No entanto, para desfechos toxicológicos complexos como toxicidade sistêmica e carcinogenicidade, ainda não há metodologia validada disponível. Os sistemas microfisiológicos surgiram como uma ferramenta promissora para essa demanda, oferecendo maior relevância comparado ao modelo animal, dada à distância filogenética entre o homem e os animais. Essa tecnologia, popularmente conhecida como organ-on-a-chip ou humanon-a-chip, possui também maior capacidade de predição em relação aos testes in vitro tradicionais que utilizam cultura de células devido à conexão entre os compartimentos de cultivo celular que simulam a complexidade de um organismo. Neste trabalho, um sistema microfisiológico foi proposto para predição de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade. No dispositivo microfluídico selecionado foram integrados equivalentes de órgãos humanos de pele, fígado e intestino, após extensa etapa de caracterização. Para avaliação dos desfechos toxicológicos, foram aplicadas substâncias conhecidas por promover eventos adversos relacionados e análises de transcriptômica foram conduzidas. O modelo se mostrou promissor para a avaliação de segurança dos desfechos toxicológicos complexos propostos.

#### ABSTRACT

The ban on animal testing for cosmetic ingredients and products is already a reality in Europe and has been gaining the force of law in several locations around the world. Consumers have free access to commercialized cosmetic products and, therefore, the safety of these products must be guaranteed. Cosmetic safety is based on the safety of each ingredient present in the formulations. Therefore, robust, and reliable methodologies must be used to assess the hazards that each ingredient poses. Currently, methodologies that do not use available animals are already available to evaluate various toxicological endpoints. However, for complex toxicological endpoints such as systemic toxicity and carcinogenicity, there is still no validated methodology available. Microphysiological systems have emerged as a promising tool for this demand, offering greater relevance compared to the animal model, given the phylogenetic distance between man and animals. This technology, popularly known as organ-on-a-chip or human-on-a-chip, also has greater prediction capacity compared to traditional in vitro tests that use cell culture due to the connection between the cell culture compartments that simulate the complexity of an organism. In this work, a microphysiological system was proposed to predict systemic toxicity and carcinogenicity. In the selected microfluidic device, equivalents of human skin, liver and intestine organs were integrated, after an extensive characterization step. To evaluate the toxicological endpoints, substances known to promote related adverse events were applied and transcriptomic analyzes were conducted. The model was considered a promising tool for the safety assessment of complex toxicological endpoints.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Testes toxicológicos em animais	12
1.2. Novas abordagens metodológicas (NAMs)	14
1.3. Avaliação de segurança de cosméticos	17
1.4. Sistemas microfisiológicos	19
1.4.1. Equivalentes de órgãos humanos	21
1.4.2. Dispositivos microfluídicos	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
4. DOCUMENTO PUBLICADO	25
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	78
7. REFERÊNCIAS	80
8. APÊNDICE	94

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Testes toxicológicos em animais

O código de Nuremberg, de 1947, estabeleceu critérios éticos para a experimentação humana após os horrores ocorridos na Segunda Guerra Mundial <sup>1</sup>. Foi estabelecido que experimentos em animais deveriam preceder estudos clínicos e justificou-se legalmente o intensivo uso de animais em experimentação científica, não porque o modelo animal pudesse predizer com acurácia efeitos em humanos, mas porque representa uma barreira ética e moral à experimentação humana <sup>2</sup>. O uso de animais como modelo de experimentação permitiu grandes avanços científicos na área da saúde, sendo de extrema importância na obtenção de benefícios essenciais para a humanidade, como o desenvolvimento de medicamentos e vacinas <sup>3</sup>.

"Animais de laboratório", como camundongos, ratos, coelhos, porquinhosda-índia e cães, também vêm sendo utilizados há muitos anos em testes toxicológicos que visam garantir a segurança de produtos de composição química, como cosméticos, medicamentos, vacinas, agroquímicos, entre outros, antes que cheguem ao mercado. Estes testes são necessários para atender aos requerimentos regulatórios e proteger os consumidores e o meio ambiente<sup>4</sup> e foram implementados obrigatoriamente após trágicos episódios ocorridos na época em que não eram exigidos ou não tinham regulamentação rigorosa. Um dos casos é o da máscara de cílios Lash Lure, em que mulheres tiveram infecções severas nos olhos após a utilização deste cosmético comercializado sem passar por testes de segurança ocular adequados, levando algumas à cegueira e uma delas à óbito <sup>5</sup>.

Os testes toxicológicos de ingredientes e produtos em animais são realizados seguindo protocolos validados cientificamente, os guias da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)<sup>6</sup>, e obedecendo à legislação, como a Lei Arouca <sup>2,7</sup> no Brasil, que regulamenta o uso científico de animais e visa promover seu bem-estar.

No Brasil, a Lei Arouca criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), órgão com diversas competências, como a formulação de normas relativas à utilização humanitária de animais em ensino e pesquisa científica e o estabelecimento de procedimentos para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal. Um passo muito importante para o bem-estar de animais de experimentação foi a exigência do CONCEA da constituição de uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para avaliar previamente os protocolos de ensino ou projetos de pesquisa científica que utilizam animais. Estas comissões certificam que o uso de animais de experimentação respeite à Lei Arouca e demais normas aplicáveis, especialmente as resoluções do CONCEA<sup>8</sup>. No entanto, apesar de toda a regulamentação e humanização no cuidado oferecido aos animais, seu uso em testes científicos causa muita controvérsia devido às questões éticas que o envolvem, visto que situações de dor e estresse, e muitas vezes necessidade de sacrifício após o teste, ainda são observados<sup>4</sup>.

Além disso, embora os modelos animais ainda sejam essenciais no desenvolvimento de novas terapias, eles têm um poder de predição limitado, pois a distância filogenética entre animais de laboratório e humanos é grande. A agência federal americana *Food and Drug Administration* (FDA) informa que aproximadamente 92% dos medicamentos aprovados em testes em animais falham quando a pesquisa é transferida para o modelo humano <sup>9–13</sup>. Desta forma, a prática do uso de animais na ciência vem sendo amplamente questionada e há grande esforço na busca por soluções que garantam a manutenção de princípios éticos para a experimentação humana e também animal <sup>2</sup>.

Devido às questões éticas, em 1959, os pesquisadores William Russell e Rex Burch descreveram o "Princípio dos 3Rs", em seu livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, consolidando o conceito de métodos alternativos <sup>14,15</sup>. O termo "método alternativo" pode ser definido como uma abordagem que atenda a um dos 3Rs, descritos a seguir. O primeiro R, de Redução, indica que o número de animais utilizado em um teste deve ser reduzido para o mínimo necessário, utilizandose o menor número de animais possível para conseguir um resultado robusto. O segundo R, de Refinamento, pede pelo refinamento das metodologias existentes, culminando com a redução significativa de dor, estresse ou desconforto sofridos pelos animais. E o último R, de Substituição e do inglês *Replacement*, ilustra os métodos que não utilizam animais, isto é, onde há a substituição completa de animais em determinado procedimento ou avaliação <sup>4,15,16</sup>.

#### 1.2. Novas abordagens metodológicas (NAMs)

O princípio dos 3Rs estimulou ações direcionadas para a substituição do uso de animais em testes toxicológicos, que tem sido um objetivo da comunidade científica há muito tempo. A indústria cosmética é a grande impulsionadora, responsável pelo maior avanço na busca de alternativas para a substituição animal nos testes <sup>17</sup>. O marco histórico para a mudança de paradigma ocorreu em 1980, quanto ativistas questionaram a utilização de coelhos em testes de maquiagens <sup>18,19</sup>. Com isso, a indústria cosmética reconheceu o impacto econômico negativo dos testes em animais e a urgente necessidade de atualizar suas práticas no desenvolvimento de produtos cosméticos <sup>2</sup>.

A sétima emenda da diretiva para cosméticos da União Europeia, que proibiu o uso de animais em testes de segurança de cosméticos, veio ao encontro destes anseios e proporcionou um grande estímulo ao desenvolvimento e validação de métodos sem a utilização de animais <sup>20,21</sup>. Esta diretiva proibiu o uso de animais na avaliação de produtos e ingredientes cosméticos para desfechos agudos de toxicidade, como irritação dérmica e ocular e toxicidade aguda oral, a partir de 2009, e para todos os desfechos toxicológicos a partir de 2013. Desde então avanços consideráveis ocorreram e vários métodos alternativos, foram desenvolvidos e validados para testes de ingredientes e produtos de composição química <sup>22–26</sup>.

Atualmente, entende-se que o termo "métodos alternativos ao uso de animais" não é a terminologia correta, visto que, para a indústria cosmética, o banimento do uso de animais de experimentação levou à obrigação de se utilizar apenas metodologias sem animais, deixando então de ser um método alternativo e sim a metodologia de escolha. Métodos substitutivos são os únicos aceitos pelas agências regulatórias nas localidades onde o banimento de testes em animais já é uma realidade. O termo "novas abordagens metodológicas" ou NAMs passou então a ser adotado. NAMs incluem metodologias *in vitro*, *ex vivo*, *in chemico* e *in silico*, além de agrupamentos estruturais e *read-across*, e estratégias de combinação entre elas <sup>27</sup>.

Modelos *in silico* são modelos computacionais capazes de predizer a toxicidade de químicos nunca testados com base na sua estrutura molecular e auxiliar na priorização destes para testes com base em seus potenciais perigos preditos. Eles também podem elucidar mecanismos de toxicidade em nível molecular,

providenciando *insights* sobre os processos biológicos envolvidos. No entanto, estes modelos têm limitações, como sua aplicabilidade à domínios químicos específicos, a dificuldade em avaliar misturas e a acurácia dependente da qualidade dos dados e dos algoritmos <sup>28</sup>. Abordagens in chemico são os testes baseados em reações químicas, sem a utilização de células ou modelos biológicos. Ensaios ex vivo se baseiam em tecidos ou partes de tecidos retirados de animais e humanos após abatimento ou cirurgia. E, por fim, testes in vitro usualmente envolvem cultivo de microorganismos ou células animais e humanas. Testes in vitro apresentam vantagens como custo-benefício, prazos mais curtos e aceitação ética em relação aos testes em animais. Estes modelos oferecem informações detalhadas sobre mecanismos celulares e moleculares e contribuem para o entendimento mecanístico da toxicidade. Além disso, modelos in vitro são mais padronizáveis e reprodutíveis do que o modelo animal, reduzindo a variabilidade dos resultados. No entanto, existem limitações como a inabilidade em mimetizar a complexidade de um organismo completo, diferenças nas condições de cultivo para o ambiente in vivo e incompatibilidades nos contextos de exposição, já que as vias e doses nem sempre refletem os cenários reais de exposição humana <sup>29</sup>.

Diversas novas abordagens metodológicas são internacionalmente validadas por centros de validação qualificados, como o EURL ECVAM<sup>30</sup> e ICCVAM<sup>31</sup>. No entanto, NAMs que sejam cientificamente válidas para responder questões toxicológicas também podem ser empregadas no processo de avaliação de segurança como peso de evidências <sup>27</sup>. Para serem consideradas cientificamente válidas, estas devem ser capazes de responder às questões pelas quais foram desenvolvidas, ser confiáveis e providenciar informações relevantes para a biologia humana. A relevância biológica das NAMs deve refletir, além do alinhamento com a biologia humana, o entendimento mecanístico dos desfechos avaliados e a geração de dados que auxiliem na tomada de decisão para proteção da saúde humana. Por fim, para estabelecer NAMs cientificamente robustas para uso regulatório, estas metodologias devem ainda ser revisadas independentemente e comunicadas de forma clara e transparente <sup>32</sup>.

No Brasil, muitos avanços ocorreram nesta área na última década, o que incluiu o surgimento de legislação específica, aceitação regulatória e implementação de novas abordagens metodológicas, treinamento de pesquisadores da academia,

indústria e agências regulatórias e extensa disseminação de informações relacionadas em eventos científicos <sup>2</sup>. A Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA) foi criada em 2012, e renovada através da portaria nº3.586 de 30 de junho de 2017 por iniciativa do Ministério da Ciência Tecnologia Inovações e Comunicações <sup>33</sup>, tendo como principal objetivo o estímulo ao desenvolvimento, à validação e à disseminação de métodos alternativos ao uso de animais no Brasil, acompanhando o panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3Rs.

Neste contexto, o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal<sup>7</sup>) produziu quatro Resoluções Normativas (RN) de grande impacto. A RN 18 de 24 de setembro de 2014 reconheceu 17 métodos alternativos validados agrupados em sete desfechos toxicológicos <sup>34</sup>, a RN 31 de 18 de agosto de 2016 reconheceu sete métodos alternativos validados agrupados em quatro desfechos <sup>35</sup> e a RN 54 de 10 de janeiro de 2022, que preconiza que os métodos alternativos já validados e com aceitação regulatória internacional passam a ser oficiais no Brasil <sup>36</sup>. Para estas três resoluções foi concedido o prazo de 5 anos, a contar da data da publicação, como limite para a substituição obrigatória do método original, realizado em animais, pelo método alternativo. Estas metodologias devem prover resultados robustos que garantam proteção aos consumidores equivalente ou superior à fornecida anteriormente pelos testes em animais que se propõem a substituir <sup>4</sup>.O ano de 2019 foi o marco inicial para que novas abordagens metodológicas fossem implementadas no Brasil e este projeto foi iniciado logo em seguida, em 2020. Em fevereiro de 2023, o CONCEA publicou a resolução normativa 58, que proíbe o uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes formulados com ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente. Embora ainda não cubra pontos importantes, como a avaliação de ingredientes inéditos, o uso de dados de outras indústrias e selos de nãotestes em animais, trata-se de um marco para o banimento de testes em animais no país.

Um projeto de lei mais abrangente sobre a proibição de testes em animais na indústria cosmética está em tramitação no governo brasileiro. O projeto PLC 70/2014 proíbe o uso de animais em testes para a indústria cosmética e já foi aprovado no Senado e agora o projeto de lei 3062/2022 aguarda designação do relator do plenário e sua aprovação na câmara dos deputados é muito esperada. Em novembro de 2023, data próxima à finalização do projeto, ocorreu o 1º Congresso Brasileiro de Métodos Alternativos<sup>37</sup>, evento que visou disseminação científica de projetos relacionados ao tema no país e contou com palestrantes renomados na área. Já o 13º Congresso Mundial de Métodos Alternativos (13th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences) também está previsto para ocorrer no Brasil em 2025 e trará pesquisadores do mundo todo para compartilhamento científico na área. Sendo assim, a necessidade de desenvolvimento de modelos de maior capacidade preditiva que identifiquem precocemente o potencial de geração de eventos adversos é uma temática atual e de extrema relevância no país e no mundo.

#### 1.3. Avaliação de segurança de cosméticos

A avaliação de segurança de cosméticos se baseia na análise do perfil toxicológico de seus ingredientes, avaliando o maior número de desfechos toxicológicos possíveis para cada ingrediente utilizado na formulação. Além disso, são considerados o modo de uso do produto, ou exposição, e o público-alvo <sup>38</sup>.

O princípio adotado para avaliar a segurança do produto cosmético é a avaliação do risco que ele oferece ao consumidor, ou seja, da probabilidade de ocorrência e severidade de um efeito adverso na saúde humana, resultante da exposição à molécula com potencial perigo. Esta avaliação consiste basicamente em 4 etapas: identificação do perigo, avaliação da dose-resposta, avaliação da exposição e caracterização do risco por meio do cálculo da margem de segurança <sup>38</sup>. Para identificação do perigo, primeiramente são buscados dados toxicológicos para cada ingrediente em literatura. Quando estes dados não são encontrados, é necessário gerá-los. As NAMs entram nesta etapa, onde são analisadas as características intrínsecas da substância e seu perfil toxicológico quanto à vários desfechos, como irritação dérmica e ocular, sensibilização cutânea, toxicidade sistêmica e inalatória, carcinogenicidade, disrupção endócrina, toxicidade ao sistema reprodutor, entre outros.

Para novos ingredientes desenvolvidos após o banimento de testes em animais, são escassas as informações toxicológicas disponíveis em literatura. Além disso, atualmente, não há métodos alternativos validados para analisar todos os desfechos toxicológicos necessários. Para avaliação de toxicidade sistêmica, por exemplo, quando há dado relevante de NOAEL, ou dose em que não se observa efeito adverso (do inglês *No Observed Adverse Effect Level*), para a molécula em estudo, tal dado é utilizado para a realização do cálculo de margem de segurança. Até o presente momento, este dado é obtido a partir de testes em animais, seguindo por exemplo o protocolo descrito no guia OECD 408<sup>39</sup> no qual ratos são expostos por via oral à substância-teste em diferentes concentrações por 90 dias e então os efeitos são avaliados. Não existe metodologia *in vitro* validada para este desfecho. Nestes casos, quando não há dado de NOAEL disponível em literatura, abordagens conservadoras que restringem a concentração dos ingredientes a fim de definir um limite seguro podem ser utilizadas, como por exemplo o racional de TTC (*Threshold of Toxicological Concern*)<sup>40</sup>, aplicável para ingredientes utilizados em baixas concentrações.

Para carcinogenicidade, o cenário é semelhante. O teste tradicional utilizado para avaliar este perigo está descrito no guia OECD 453<sup>41</sup>, realizado em roedores por via oral e com duração de 2 anos. Não existe metodologia validada para este desfecho toxicológico como um todo. A carcinogenicidade pode se dar por dois tipos de mecanismos: genotóxicos e não-genotóxicos<sup>42</sup>. Existem metodologias *in vitro* validadas para avaliação do potencial genotóxico, como o teste de Ames<sup>43</sup> (OECD 471) e o teste de micronúcleo<sup>44</sup> (OECD 487), no entanto, caso ambos gerem resultados negativos, há ainda a possibilidade de potencial carcinogênico por mecanismos não-genotóxicos, para os quais não há metodologia validada. O ensaio de transformação celular (CTA, do inglês *Cell Transformation Assay*) tem se mostrado uma alternativa promissora para avaliação de carcinogenicidade, genotóxica e não-genotóxica, porém é um método com limitações e ainda não validado<sup>45</sup>. Novas abordagens metodológicas que cubram estes desfechos complexos e possibilitem a derivação de doses seguras de uso de compostos químicos para utilização em cálculos de segurança são, portanto, muito necessárias.

Até recentemente, as NAMs disponíveis estavam envolvidas apenas na etapa de identificação do perigo que os ingredientes cosméticos oferecem aos seus consumidores. Atualmente, diversas metodologias robustas desenvolvidas são capazes de derivar uma dose segura, conhecida como ponto de partida ou *PoD* (do inglês, *Point of Departure*), a partir da qual entende-se que o risco de ocorrer um evento adverso é baixo. A utilização destas doses nos cálculos de segurança, após

aplicação de modelos de cinética baseados em fisiologia (PBK) para extrapolação de doses *in vitro* para *in vivo* e de fatores de incerteza para ajuste da dose segura, possibilita uma avaliação de risco sem a utilização de animais, conhecida como avaliação de risco de última geração ou NGRA (do inglês, *next-generation risk assessment*). NGRA é uma avaliação de risco relevante para humanos, que leva em conta a exposição a cada ingrediente e é projetada para prevenir a ocorrência de efeitos relacionados a um perigo. Este tipo de avaliação integra diferentes NAMs não só para avaliação de perigo, mas para tomada de decisão quanto à segurança de forma robusta e relevante para a saúde humana e sem a utilização de animais <sup>27,46</sup>.

Após a certificação da segurança de cada ingrediente presente nas formulações, estas podem ser submetidas a testes clínicos que corroboram com a segurança do produto cosmético e então o produto pode ser comercializado após notificação ou registro na agência regulatória. No caso do Brasil, a Anvisa é a agência regulatória responsável e os produtos devem ser notificados ou registrados dependendo de sua categoria <sup>47</sup>.

#### 1.4. Sistemas microfisiológicos

Os tradicionais testes em animais e as atuais metodologias realizadas *in vitro* têm poder de predição limitado, pois falham na mimetização da complexidade dos sistemas de órgãos do corpo humano. Os animais garantem acesso à fisiologia sistêmica, no entanto os testes pré-clínicos em animais são incapazes de predizer com acurácia os efeitos observados em seres humanos, devido à distância filogenética, às diferenças anatômicas e fisiológicas e às particularidades metabólicas, imunológicas, entre outras que os separa<sup>16</sup>. Métodos *in vitro* que envolvem cultivo convencional de células humanas apresentam limitações quanto ao aspecto sistêmico, sendo incapazes de emular fatores importantes da fisiologia humana, como a conexão entre diferentes órgãos. Os métodos disponíveis frequentemente não predizem com acurácia a possível toxicidade do composto estudado, levando à altas taxas de atrito e incoerências na fase dos estudos clínicos, sendo assim necessário o desenvolvimento de métodos alternativos mais fisiológicos, preditivos e eficazes para a realização de testes toxicológicos <sup>3,9,16</sup>.

Modelos mais preditivos são baseados na toxicologia no século 21, que ressalta a importância do uso de material biológico de origem humana e aplicação de tecnologias baseadas em ciências modernas como ômicas e toxicologia

computacional para entendimento mecanístico dos efeitos adversos. A substituição de testes toxicológicos tradicionais, baseados em animais inteiros, por testes *in vitro* que avaliam mudanças em processos biológicos utilizando células ou tecidos preferencialmente de origem humana trazem uma visão aprofundada do modo de ação dos agentes químicos. A aplicação de tecnologias robustas de análise é capaz de explicar como as substâncias agem nos organismos causando toxicidade, aumentando assim a relevância dos resultados em vista do material biológico humano 48.

Os Sistemas Microfisiológicos (SMFs), também conhecidos como *organon-a-chip* ou *human-on-a-chip*, são compostos por uma combinação de equivalentes de órgãos humanos cultivados em dispositivos microfluídicos e podem se tornar a solução translacional para o dilema dos testes pré-clínicos, visto que abrangem tanto o aspecto humano quanto o aspecto sistêmico <sup>16,49,50</sup>. A utilização de células humanas no desenvolvimento dos equivalentes de órgãos e a interconectividade entre os diferentes compartimentos de cultura nos dispositivos microfluídicos aumentam muito a relevância fisiológica deste tipo de tecnologia <sup>51</sup>.

Estes dispositivos têm aplicação em diferentes áreas como desenvolvimento de medicamentos, medicina personalizada e na toxicologia, aplicação diretamente relacionada às indústrias que utilizam ingredientes químicos, como a cosmética <sup>52–54</sup>.

Os SMFs oferecem um meio sofisticado para avaliação de desfechos toxicológicos, incluindo os desfechos complexos como toxicidade sistêmica, carcinogenicidade e desregulação endócrina, para os quais existem desafios no desenvolvimento de novas abordagens metodológicas. Estas ferramentas podem ser integradas no processo de avaliação de segurança e, combinadas a técnicas analíticas robustas como ômicas, são modelos promissores para obtenção entendimento mecanístico e de doses que não geram efeitos adversos, a serem utilizadas nos cálculos para definição de concentrações seguras de uso em produtos. Desta forma, esta valiosa abordagem pode ser aplicada no processo de avaliação de segurança de ingredientes químicos e contribuir para o peso de evidências, impactando na tomada de decisão<sup>55</sup>.

#### 1.4.1. Equivalentes de órgãos humanos

Os SMFs são compostos por equivalentes de órgãos humanos integrados em dispositivos microfluídicos. Os equivalentes de órgãos humanos devem ser cultivos celulares capazes de emular a funcionalidade do órgão-alvo. Estas unidades funcionais podem ser culturas de células 2D ou culturas 3D, as últimas mais promissoras na simulação do microambiente fisiológico e da histoarquitetura dos órgãos, o que impacta diretamente em sua funcionalidade. Exemplos de cultivos celulares 3D são as barreiras tridimensionais, os esferoides e os organoides. O cultivo celular 3D representa melhor as estruturas teciduais e a morfologia *in vivo*, além de refletir melhor processos de diferenciação, comportamento e interações intercelulares, o que leva à uma fisiologia mais próxima do que ocorre no corpo humano e, portanto, à modelos biológicos mais preditivos <sup>56</sup>.

Para o desenvolvimento de equivalentes de órgãos humanos é necessário conhecimento avançado em bioengenharia. Os equivalentes já desenvolvidos e caracterizados incluem esferoides de fígado<sup>57</sup>, pele reconstruída<sup>58</sup>, equivalente de barreira renal<sup>58</sup>, de epitélio intestinal<sup>57</sup> e de pulmão<sup>59</sup>, esferoide cardíaco<sup>60</sup>, vasos sanguíneos<sup>61</sup>, entre outros.

A combinação de diferentes equivalentes deve ser selecionada de modo a responder às perguntas de interesse. Uma combinação de cultivos 3D de pele, fígado e intestino é interessante para avaliar, por exemplo, o potencial de substâncias de causar efeitos sistêmicos, como toxicidade sistêmica e carcinogenicidade, após exposição tópica, modelo de extrema relevância para a indústria cosmética.

#### 1.4.2. Dispositivos microfluídicos

Há uma variedade de dispositivos microfluídicos em desenvolvimento e disponíveis no mercado. Dentre os pontos que os diferem estão o tipo de material, a quantidade de compartimentos, e o tipo de fluxo, isto é, passivo ou ativo. No entanto, todos têm o objetivo principal de simular o ambiente fisiológico a que se propõem.

Quanto à quantidade de compartimentos, existem dois principais tipos: *single-organ systems*, aqueles que abrigam um único equivalente de órgão de forma a propiciar o ambiente ideal para a sua função-chave, podendo ser conectado externamente a outros dispositivos microfluídicos ou não; e *multi-organ systems*, dispositivos onde mais de um cultivo celular pode ser integrado em diferentes compartimentos e que, além de propiciar um ambiente adequado para a função-chave de cada órgão, ainda conta com a interação entre os diferentes compartimentos, o que garante o aspecto sistêmico<sup>62</sup>.

Nos dispositivos microfluídicos *multi-organ*, os cultivos celulares são conectados por canais à semelhança do sistema circulatório humano, permitindo além do cultivo tridimensional com contato intercelular, a conexão entre diferentes cultivos e a presença de estímulo mecânico ou cisalhamento o que impacta na morfologia e em aspectos funcionais dos tecidos <sup>16</sup>.

Os sistemas microfisiológicos visam reconstituir e se assemelhar ao máximo, *in vitro*, da fisiopatologia de um órgão funcional do corpo humano, produzindo níveis de funcionalidade não alcançados ou possíveis através do uso do método de cultura de células convencional. Isto se dá devido à conexão entre os diferentes compartimentos, o que possibilita troca de moléculas de sinalização entre os diferentes órgãos emulados, como citocinas e metabólitos, além do impacto da presença do próprio fluxo circulante, como ocorre no organismo humano. Para isso, é importante garantir um fluxo fisiológico adequado no sistema e os parâmetros podem ser alterados caso a caso, de acordo com o número e tipo de equivalentes de órgãos presentes e o tipo de dispositivo microfluídico. Essas características proporcionam a emulação das condições *in vivo* e supostamente levam a um padrão de resposta mais semelhante ao de um organismo vivo <sup>16,49,57</sup>.

Embora ainda não esteja pronta para uso regulatório e necessite de aperfeiçoamentos e validações, a tecnologia baseada em sistemas microfisiológicos, combinando equivalentes de órgãos humanos em dispositivos microfluídicos, será provavelmente o modelo padrão utilizado no desenvolvimento e nos testes de segurança de cosméticos e fármacos num futuro próximo <sup>16,49,63–65</sup>.

#### 2. JUSTIFICATIVA

A compra e utilização de produtos cosméticos não é regulada e produtos de diferentes categorias, como sabonetes, shampoos, maquiagem, desodorantes, perfumaria, entre outros, são utilizados diariamente por grande parte da população. Tais produtos, compostos por diferentes ingredientes, precisam passar por uma avaliação de segurança robusta e criteriosa antes da disponibilização no mercado. Entretanto, a utilização de modelos animais para testes deste tipo de produto, além de fugir totalmente aos princípios éticos, não se justifica ou se aplica.

Com isso, a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais, em especial aqueles que substituem o modelo animal, denominados novas abordagens metodológicas (NAMs), mais preditivos para testes toxicológicos de ingredientes cosméticos de diferentes naturezas é urgente. Atualmente, não existem métodos alternativos in vitro validados para todos os desfechos toxicológicos requisitados na avaliação de segurança deste tipo de produto. Muitos novos ingredientes, para os quais não há dados em literatura, são avaliados por cálculos teóricos conservadores, que adotam o cenário mais crítico visando a proteção do consumidor e restringem ao máximo sua concentração nas formulações, mesmo quando não há sinalização clara de perigo, penalizando tais ingredientes e impactando na performance e benefícios atrelados ao produto.

Este projeto, a ser aplicado na indústria cosmética, visou desenvolver novas abordagens metodológicas para possibilitar a avaliação de segurança toxicológica de ingredientes e produtos cosméticos em desfechos toxicológicos complexos importantes, se equiparando ao estado da arte em avaliação toxicológica in vitro.

#### 3. OBJETIVOS

Estabelecer análises de substâncias de uso tópico, por meio de transcriptômica, dos desfechos fisiológicos de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade utilizando-se de um modelo de sistema microfisiológico humano de cultivo simultâneo de 3 equivalentes de órgãos.

Para tanto, os seguintes objetivos específicos deverão ser alcançados:

 Levantamento de marcadores de expressão de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade.

 Montagem de painéis de assinatura gênica para avaliação dos desfechos toxicológicos supracitados.

 Produção e caracterização de culturas 3D de fígado, modelo de equivalente de pele humana e barreira intestinal.

 Integração das culturas 3D em modelo microfisiológico humano no dispositivo HUMIMIC Chip3 (TissUse GmbH).

• Seleção de substâncias e suas respectivas doses que promovam efeitos de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade.

 Tratamento das culturas integradas no modelo microfisiológico humano com veículo e substâncias selecionadas.

• Extração de RNA das culturas, produção de cDNA e análise de qPCR utilizando-se os painéis de expressão gênica montados para cada desfecho.

• Avaliação dos dados de expressão gênica para comprovação da funcionalidade dos painéis gênicos desenvolvidos e da metodologia proposta.

## 4. DOCUMENTO PUBLICADO



Combining a microphysiological system of three organ equivalents and transcriptomics to assess toxicological endpoints for cosmetic ingredients †

Check for updates

 Nathalia de Carvalho Indolfo, (i)
 ab
 Melissa Dibbernn Ganzerla, cd
 Tábata Renée Doratioto, (i)
 a

 Thayná Mendonça Avelino, d
 Larissa Bueno Tofani, (i)
 d
 Luis Antonio Peroni, d
 Renata Santos

 Rabelo, c
 Kelen Fabiola Arroteia
 and Ana Carolina Migliorini Figueira
 (i)
 d

Article information	
https://doi.org/10.10	39/D3LC00546A
Article type	Paper
Submitted	21 Jun 2023
Accepted	15 Oct 2023
First published	01 Nov 2023

# **Rights retained by authors**

When the author accepts the exclusive licence to publish for a journal article, he/she retains certain rights that may be exercised without reference to the Royal Society of Chemistry.

Sharing rights	Accepted manuscript	Version of record
Share with individuals on request, for personal use	$\checkmark$	$\checkmark$
Use for teaching or training materials	$\checkmark$	$\checkmark$
Use in submissions of grant applications, or academic requirements such as theses or dissertations $\!\!\!\!\!^\star$	$\checkmark$	$\checkmark$
Share with a closed group of research collaborators, for example via an intranet or privately via a <u>scholarly communication network</u>	$\checkmark$	$\checkmark$
Share publicly via a scholarly communication network that has signed up to STM sharing principles	⊠	×
Share publicly via a personal website, institutional repository or other not-for-profit repository	⊠	×
Share publicly via a scholarly communication network that has not signed up to STM sharing principles	×	×

\*You may include your article in the electronic version of your thesis or dissertation as long as it is not made available as a separate document.

# Combining a microphysiological system of three organ equivalents and transcriptomics to assess toxicological endpoints for cosmetics ingredients

**Author names and affiliations:** Nathalia de Carvalho Indolfo<sup>a,b</sup>, Melissa Dibbernn Ganzerla<sup>c,d</sup>, Tábata Renée Doratioto<sup>a</sup>, Thayná Mendonça Avelino<sup>d</sup>, Larissa Bueno Tofani<sup>d</sup>, Luis Antonio Peroni<sup>d</sup>, Renata Santos Rabelo<sup>e</sup>, Kelen Fabiola Arroteia<sup>a</sup> and Ana Carolina Migliorini Figueira<sup>d\*</sup>

- a. Natura Cosméticos S.A., Cajamar, São Paulo, Brazil
- b. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, State University of Campinas, Brazil
- c. Graduate Program in Molecular and Morphofunctional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Brazil
- d. Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil
- e. Brazilian Synchroton Light Laboratory (LNLS), Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil

\*Corresponding author: Ana Carolina Migliorini Figueira - ana.figueira@Inbio.cnpem.br

## ABSTRACT

Animal testing for cosmetics ingredients and final products has been banned in Europe and is gaining legal force worldwide. However, the need for reliable testing methodologies remains for safety assessment of cosmetics ingredients. While new approach methodologies exist for many toxicological endpoints, some complex ones lack appropriate testing methods. Microphysiological systems (MPS) have emerged as a promising tool to address this gap in pre-clinical testing, offering higher predictivity compared to animal models due to the phylogenetic distance between humans and animals. Moreover, it provides a more physiological approach than traditional in vitro testing by mimicking interconnections between different culture compartments as seen in complex organisms. This study presents a three-organ microfluidic MPS comprising skin, liver, and intestine equivalents. Combining this model with gene expression analysis, we evaluated toxicological endpoints of chemicals, demonstrating its potential for diverse applications. Our findings highlight the MPS model as a reliable and ethical method to be applied in an integrated approach for safety assessment in the cosmetics industry. It offers a promising strategy to evaluate toxicological endpoints for cosmetics ingredients and other chemicals, supporting the elimination of animal testing while ensuring consumer safety.

#### INTRODUCTION

The safety assessment of cosmetics involves a comprehensive analysis of the toxicological profile of each chemical in the formulation, encompassing various potential hazards such as skin sensitization, dermal and ocular irritation, mutagenicity, genotoxicity, systemic and inhalation toxicity, carcinogenicity, endocrine disruption, and reproductive toxicity. Risk evaluation considers the mode of use and the target audience, with safety margins calculated through hazard identification, dose-response assessment, exposure assessment, and risk evaluation processes<sup>1</sup>.

When related to chemicals used in cosmetics, this process is changing due to the increasing number of bans on animal testing worldwide<sup>2</sup>. To bridge this gap, new approach methodologies (NAMs) are being developed and implemented to evaluate the potential hazards of these chemicals. NAMs integrate in silico, in chemico, and in vitro testing to provide next-generation risk assessment (NGRA), enabling the safety assessment of ingredients and final products<sup>3,4</sup>.

In silico methods offer advantages such as predicting the toxicity of untested chemicals and prioritizing chemicals for further testing based on their potential harm. They can also elucidate molecular-level mechanisms of toxicity, providing valuable insights into the underlying biological processes. However, these models have limitations, including their applicability to specific chemical domains, the assessment of mixtures, and the accuracy dependent on input data and algorithms. Extrapolating in silico predictions to humans can be complex due to interspecies differences and the inability to capture multi-pathway and multi-toxicity interactions<sup>5</sup>.

In vitro testing presents advantages such as cost-effectiveness, reduced time requirements, and ethical acceptability compared to animal testing. These models offer detailed information on cellular and molecular mechanisms of toxicity, contributing to a better understanding of chemical toxicity and the development of safe and effective raw materials. Additionally, these models can be more standardized and reproducible than animal studies, reducing data variability. However, limitations exist, including the inability to fully mimic the complexity of whole organisms and their responses to chemicals, differences in culture conditions from in vivo environments, and potential mismatches between exposure contexts, in which the routes and doses may not always reflect realistic human exposure scenarios<sup>6</sup>.

To ensure a comprehensive and accurate safety assessment of cosmetics, it is essential to recognize the limitations of each method and to utilize a combination of new approach methodologies (NAMs). Microphysiological systems (MPS) have emerged as a promising tool that can be integrated into next-generation risk assessments (NGRA). These systems employ human cells to create organ equivalents, and the interconnectedness of various culture compartments within microfluidic devices enhances their physiological relevance<sup>7</sup>. MPS offers a sophisticated means to evaluate intricate toxicological endpoints, encompassing systemic toxicity, carcinogenicity, and endocrine disruption, which often present significant challenges for other in vitro methods. It serves as a valuable tool within the chemical safety assessment process, contributing to a weight of evidence that aids in decision-making. This cutting-edge technology finds versatile applications in addressing a wide array of scientific inquiries. When coupled with robust omics techniques like transcriptomics analysis, MPS delivers precise and mechanistic assessments of toxicological endpoints. It exemplifies a state-of-the-art approach to toxicology in the 21st century, promising more comprehensive insights and improved decision-making processes<sup>8</sup>.

Several MPS development have been made in different area of interests, for application as NAMs for evaluation of safety assessment process within pharmacological, biotechnology, cosmetic and agrichemical industries<sup>9,10</sup>. Specifically in cosmetics, MPS are emerging as a progressive field within the cosmetics industry, offering a humane and innovative approach to toxicity testing. Designed to replicate intricate human organ interactions, these systems hold great potential for predicting cosmetic ingredient safety without resorting to animal testing. The use of MPS in cosmetics sector. It is anticipated that, as research advances, MPS may become validated in vitro alternatives for various toxicological evaluations. This shift reflects a broader trend away from traditional one-to-one animal test replacements towards more comprehensive, multifaceted testing approaches <sup>11,12</sup>.

In this context, here we developed a three-organ MPS model comprising equivalents of liver, intestinal barrier, and human reconstructed skin. Through the integration of gene expression analysis, we demonstrated the potential of this model for safety assessment of chemicals, suggesting a new assay which can be applied in the industry for this purpose. Our primary focus was on ingredients that are topically absorbed. Nevertheless, it's crucial to acknowledge that our model has the capacity to evaluate substances absorbed through both topical and oral routes. In both scenarios, our model can forecast how molecules might influence the emergence of intricate toxicological outcomes, encompassing acute systemic toxicity and carcinogenicity. Our findings highlight the potency of this model in supporting accurate and reliable safety assessments of cosmetics ingredients, addressing the increasing bans on animal testing worldwide and serving as a promising NAM.

### MATERIALS AND METHODS

#### Selection of device

To emulate part of the systemic physiology of a human body, we chose HUMIMIC Chip3plus, from TissUse GmbH, as our microfluidic devices. These devices are multi-organ systems able to co-cultivate up to three organ equivalents and must be connected to a control unit in which the flow parameters are setted<sup>13</sup>.

#### Cell sources and 3D cultures

Our reconstructed human full skin was produced using 3D bioprinting technology, as previously described<sup>14,15</sup>, using primary human keratinocytes and fibroblasts, purchased from BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro) and Thermo Fisher Scientific, respectively. Briefly, the collagen based bioinks with primary dermal fibroblasts were loaded form the dermis layer. The epidermis layer was applied under the dermis, through the seeding of primary keratinocytes, which were kept on an airliquid surface for cell differentiation. 3D skin printing and cultivation were carried out on cell culture inserts measuring 1.12 cm<sup>2</sup> in cell growth area (Corning). After printing and following 10 days of differentiation, the 3D bioprinted full skin reaches complete maturation and can be transferred to 0.6 cm<sup>2</sup> inserts (PIHP01250, Merck Millipore), which fits in the MPS. The equipment used for printing was a bioprinter (Cellink), and the print parameters were set in g code files.

Hepatic spheroids were constructed according to previous reports<sup>16,17</sup> using the human HepG2/C3A cell line, purchased from BCRJ, and human primary hepatic stellate cells (HHSteC), which were obtained from ScienCell Research Laboratories. Briefly, the spheroids were manufactured using 2% agarose micro-molds (Merck), in which 1.92x10<sup>6</sup> HepG2/C3A cells and 8x104 HHSteC were seeded. After cells settle down, the wells containing the micro-molds are filled with cell media for three days of cultivation. The spheroids were removed from the molds and characterized. 20 spheroids were loaded in each microphysiological system <sup>7</sup>.

To construct the intestinal barrier, human intestinal cell lines Caco-2 and HT-29, obtained from BCRJ, were cultivated as described in Marin et al<sup>18</sup>. Our intestinal barrier model was developed in cell culture inserts (PIHP01250, Merck Millipore). After plating, the cell barrier was maintained in culture for differentiation for 21 days, with media exchange each 2 days. Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured every 3 days to evaluate barrier integrity and robustness. A value in the range of 50-180  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> was expected to mimic human small intestine <sup>19,20</sup>

All cells and organ equivalents were cultured under standard cell culture conditions (37°C and 5% CO<sub>2</sub>). It is important to note that all procedures were approved by an ethical committee (CAAE 58231921.8.0000.5599), and all primary cells were purchased from reputable sources.

## **3D culture characterization**

*Viability assay* - Tissue culture characterization was performed to ensure the viability and functionality of the organ equivalents prior to integrating them into the microfluidic devices. To assess viability, the MTT assay, and the CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega) were used. These assays were conducted following the manufacturer's instructions.

*Epithelial integrity* - Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured in the Millicell® ERS-2 Voltohmmeter (Merck, Millipore) every 3 days to evaluate barrier integrity, differentiation, and robustness. A TEER value ranging from 50-180  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> was expected to mimic the human small intestine<sup>19,20</sup>. A permeability test using dextran Alexa Fluor 488; 10,000 MW; anionic; fixable (Sigma Aldrich) was also conducted for skin and intestinal barrier equivalents to assess their permeability. The reagent was diluted in Hank's buffer solution and empty inserts were employed as control. For intestine equivalents, the dextran initial concentration was 0.2 mg/mL and for skin equivalent 1 mg/mL<sup>21,22</sup>. Fluorescence measurements were performed using the Inspire plate reader (PerkinElmer) at 495 nm excitation and 519 nm emission.

*Metabolic activity assays* - Metabolic activity of the intestine and liver equivalents tissues was assessed through its secretome by monitoring glucose, triglycerides, and cholesterol directly from culture media. The Glucose GOD-PAP (LaborLab) was used to measure glucose levels, while the Triglycerides GOD-PAP Liquid Stable kit (LaborLab) and the Cholesterol COD-PAP Liquid Stable (LaborLab) were used for dosing triglycerides and cholesterol, respectively. Values from background measures of cell culture media were discounted from each reading and results were plotted as the amount of each compound produced in the media or culture.

Histology and optical microscopy – In short, the 3D cell cultures were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, 4°C. Afterwards, they were dehydrated, embedded into a paraffin block, cut into 5 µm sections and stained with hematoxylin-eosin by standard procedures for histological analysis. The brightfield images of each tissue slice were captured with a digital camera mounted on an upright light microscope (Leica FS DM6), using 10x, 20x and 40x objectives23. Alcian blue (B8438, Sigma Aldrich) and Safranin O solution (1:1 in water) (84120, Sigma Aldrich) was also used for intestinal barrier equivalents to check for the presence of mucus24. Samples were incubated for 30 minutes with Alcian blue, followed by 5 minutes with Safranin O solution, and images were obtained in the vertical microscope Leica© DM6 (Leica). Liver spheroids size was acquired in Operetta High-content Analysis System (Perkin Elmer), through Measurement tool.

*Fluorescence microscopy* – Immunofluorescence analyses were conducted to evaluate the morphology of the liver and intestine equivalents and skin differentiation. Liver spheroid tissue sections were stained with 10 mg/mL DAPI (Biotium) at 1:1000 dilution to stain the cell nucleus, 300 units rhodamine/phalloidin (Sigma Aldrich) at 1:40 dilution to stain the cytoskeleton, and the antibody anti-CYP3A4 (Invitrogen) at 1:100 dilution to identify the expression of CYP3A4, responsible for metabolism and detoxification of toxic compounds<sup>25</sup>. Intestinal barriers were stained with DAPI, rhodamine/phalloidin, and occludin (Invitrogen) at 1:100 dilution to stain the tight junctions, which are important structures for intestinal barrier robustness<sup>26</sup>. Skin differentiation was evaluated by using 10 mg/mL DAPI (Biotium) at 1:1000 dilution, antibody anti HAS-2 (Thermo Fisher Scientific) at 1:50 dilution, and antibody anti involucrin (Thermo Fisher Scientific) at 1:50 dilution, which are markers of skin differentiation and

hydration <sup>27–30</sup>. Confocal microscope Leica© TCS SP8 (Leica) was used to obtain the images.

Scanning Electron Microscopy (SEM) – SEM was performed using a Inspect F50 (Thermo Fisher), which has a FEG Schottky electron gun and acceleration voltage between 500 V and 30 kV, at the National Nanotechnology Laboratory of CNPEM. For this analysis, the intestinal barrier was rinsed with FBS-free DMEM and subsequently immersed in a fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1 mol L–1, pH 7.4) with 3 mmol L–1 calcium chloride at room temperature. Afterward, the samples were stored at 4°C overnight. The next day, they were rinsed with cacodylate buffer containing calcium chloride and sequentially dehydrated using an ethanol series (15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, and 100% ethanol). Finally, the samples underwent drying in a Bal-Tec CPD-030 critical point dryer, were gold-coated using a Bal-Tec MD020 instrument (Leica), mounted on stubs, and analyzed in a Inspect F50 (Thermo Fisher Scientific) scanning electron microscope at an acceleration voltage of 5 kV.

*Gene expression* - Real-time qPCR analyses were performed to evaluate gene transcription at the mRNA level for the organ equivalents to evaluate their physiological potential after biofabrication and, also, to evaluate the gene signatures developed for the endpoint analysis after microphysiological system integration and treatments. The equivalents were collected, and RNA extraction was conducted using the PureLink<sup>™</sup> RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized by reverse transcription of 1000 ng total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Real-time qPCR experiments were performed using the StepOnePlus system (Thermo Fisher Scientific) and the TaqMan<sup>™</sup> Fast Universal PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

The real-time qPCR primers used for organ equivalents characterization are described in Table 1. After verifying its suitability, GAPDH and HPRT1 were used to normalize gene expression. Fold changes were calculated using the  $2-\Delta\Delta$ Ct method as described<sup>31</sup>. For evaluation of gene signatures after microphysiological system integration and treatments, we employed customizable genetic panels available in 96 well plates from Thermo Fisher Scientific. The gene expression data were statistically

compared using the Mann Whitney test (non-parametric t-test; p < 0.05), using Prism 5.01 software (GraphPad Software).

**Table 1.** Real-time qPCR primers to evaluate gene transcription at mRNA level for intestine and liver equivalents.

Gene symbol	Gene description	Primer sequence
СҮРЗА4	Cytochrome P450	F: TGGGGCCTTTGTCAGAACTA
		R: AGCCACTGTGCCTGATCAAA
BSEP	Bile Salt Export Pump	F: ACGCTCCAAGTCTCAGCTTT
		R: TGGGGCAGGTTCAACTTCTT
ALB	Albumin	F: TCAAGTGTGCCAGTCTCCAA
	Albuillin	R: TCAAGCAGATCTCCATGGCA
	Peroxisome Proliferator	F: TTCGCCATGCTGTCTTCTGT
PPARA	Activated Receptor Alpha	R: TGTCATCCAGTTCCAGTGCA
FTL	Ferritin Light Chain	F: AGGACATCAAGAAGCCAGCT
		R: AAGGGCCTGGTTCAGCTTTT
FTH1	Ferritin Heavy Chain 1	F: TCTTTGACAAGCACACCCTG
		R: AAACCCCAACATGCATGCAC
SI CEA 1	Solute Carrier Family 5	F: ACCTTGGCTGAGTCCCTAAA
SLCSAI	Member 1	R: ACCGGGCCTTTTAAGCAGTA
ATP1A1	ATPase Na+/K+ Transporting	F: ATGCGGAGGAAGTTGTGGTT
	Subunit A1	R: AGTTATCCACCTTGCAGCCA
	ATP Binding Cassette	F: AGCTGTTGTCTTTGGTGCCA
ADCDI	Subfamily B Member 1	R: TGATGATGTGGGCTGCTGAT
TJP1	Tight Junction Protein 1	F: AAACAGCCAGCCGTTAGTCA
		R: AGGTCTCTGCTGGCTTGTTT
MUC2	Mucin 2	F: TGGCTTTGATGTCTGCGTGA
		R: AGGCAGACACAGTTCTGCA
CLDN2	Claudin 2	F: TGTCCACCTTCTTGCCATGT
		R: AATGAAGGAGGTGACGCTGA

## Model treatment and dose definition

To evaluate the effectiveness of our microphysiological system in assessing toxicological endpoints such as carcinogenicity and systemic toxicity, we selected model substances that are already known to cause these effects. Acetaminophen (also known as paracetamol or APAP) was chosen to simulate systemic toxicity, as it is well-known for its hepatotoxic effects and can also affect the gastrointestinal system <sup>18,32–</sup> <sup>40</sup>. Formaldehyde, which is already classified according to the Globally Harmonized

System of classification and labelling of chemicals (GHS) as a human carcinogenic substance, was selected to assess carcinogenicity <sup>41–43</sup>.

To determine if the chosen substances can be dermally absorbed and reach other organ equivalents, we used the CDC Skin Permeation Calculator<sup>4,44</sup>, inputting the physicochemical properties of each substance and the characteristics of our reconstructed skin model. To identify a dose that could cause the desired effect by altering gene expression, while maintaining cell viability at no less than 60%, we conducted viability assays in monolayers of fibroblasts, keratinocytes and in liver equivalents; and gene expression assays in liver equivalents to select the appropriate doses.

#### Gene signatures panels design

The evaluated gene signatures developed for the endpoint analysis consist of sets of genes that are differentially expressed in the biological model following a treatment of interest. These gene panels can serve as a predictive signature for toxicological outcomes, as changes in gene expression after exposure to xenobiotics can reflect early and mechanistically relevant cellular events that contribute to the initiation and progression of adverse effects <sup>45</sup>.

To apply these gene signatures, we employed customizable genetic panels available in 96 well plates from Thermo Fisher Scientific. Each panel contained four control housekeeping genes: GAPDH, GUSB, HRPT, and 18s rRNA<sup>46</sup>. Additionally, we selected 92 gene markers associated with specific toxicological endpoints based on well-established scientific articles and specialized databases such as GeneCards<sup>47</sup> , Comparative Toxicogenomics Database<sup>48,49</sup> and The Human Protein Atlas<sup>50</sup>. To ensure accurate normalization of gene expression data, we employed the Expression Suite Software and identified the optimal control housekeeping gene <sup>51</sup>. Due to industrial confidentiality reasons, we will not provide a detailed list of all the genes of the panel evaluated in the study. However, the key genes related to the pathways under investigation in this study are presented in Supplementary Table 1.

#### Microphysiological System (MPS) Assembly

The assembly process of the HUMIMIC Chip3plus devices involved some steps. Firstly, the devices were filled with cell media, followed by the addition of organ

equivalents. Prior to introducing the organ equivalents, the devices underwent a 24hour flux to eliminate any remnants of the manufacturer's solution. The integration of organ equivalents was carried out as follows: the first, larger compartment received the intestinal barrier equivalent, while the second larger compartment accommodated the bioprinted 3D full skin model. In the smaller third compartment, 20 hepatic spheroids were placed. To support the growth and function of each organ equivalent, a specific cell media combination was used. The basal portion of the intestinal barrier equivalent received 300µL of supplemented DMEM cell media, while an additional 200µL of the same media was added to the apical portion. In the second compartment containing the skin equivalent, 300µL of supplemented DMEM/HAM F-12 cell media was added to the basal portion. Lastly, in the third compartment, 200µL of supplemented DMEM cell media volume of 1mL within the circuit.

The set HUMIMIC Chip3plus devices were connected to the control unit for control and regulation of microfluidic pump conditions. The following parameters were set: a pressure of 300mbar, a vacuum of -300mbar, and a frequency of 0.5Hz, based on these parameters the flow rate is automatically adjusted by the control unit 52. Throughout all experiments, the devices were maintained in the incubator under standard cell culture conditions.

#### **MPS-Based Co-Cultures Treatment and Characterization**

To evaluate toxicological endpoints of cosmetics ingredients, our focus was on topical treatments applied to the skin equivalent. However, it's worth noting that this MPS system also allows for oral administration via the intestinal barrier. For each toxicological endpoint under investigation, our experimental approach involved using cell culture media as the negative control, while the selected substances were administered at predetermined doses, diluted in cell media, topically at the skin compartment of the chip. We then assessed the modulation of gene expression in the organ equivalents integrated into the MPS. For systemic toxicity the gene expression was assessed for liver and intestine equivalents and for carcinogenicity the gene expression, skin, liver, and intestinal barriers were evaluated in both endpoints, systemic toxicity, and carcinogenicity. After assembling the MPS, we applied 20µL of the substance solution to the skin epidermis. The chips were connected to the control unit, and the exposure was maintained for 24 hours. For each condition three chips were used to evaluate the viability of the organ equivalents post-treatment using MTT assays. Additionally, we employed three chips to assess the potential modulation of gene expression following the same treatments, employing the gene signature panels developed for each specific toxicological endpoint. All experiments were conducted in triplicate to ensure robustness and reliability of the results. To analyze the modulation of biological pathways using the gene expression data, we utilized Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (QIAGEN).

#### Cytokines secretion measurements

After the treatments, the culture media was collected in each condition to evaluate the secretion of inflammatory cytokines IL1 and IL-6 in the culture media. Global secretion of IL-6 and IL-1 was measured to assess the inflammatory scenario in the circulating culture media in the three chambers of the microfluidic devices, through ELISA assay. All Sandwich ELISA assays were performed in flat bottomed-96 wells plates (Immuno Maxisorp, Nunc, Thermo Fisher). Briefly, the plates were coated with 100µL/well anti-human IL-1 or anti-human IL-6, rabbit polyclonal antibody (Rheabiotech Co, Brazil) in 50mM sodium carbonate buffer, pH 9.6 and placed at 4°C, overnight. The wells were washed three times in phosphate buffer saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). To avoid nonspecific binding, the wells were incubated with PBS + 1% bovine serum albumin (BSA) for 1h at 37°°C. After washing, the wells were incubated with 100µL/well of negative control, standard curve (recombinant antigens diluted in PBS at 0 to 1000pg/ml) and samples (no dilution) for 1h at 37°C. After washing three times with PBS-T, 100µL/well of detection antibody, anti-human IL-1 or anti-human IL-6 mouse monoclonal antibody (Rheabiotech Co.) was added and incubated for 1h at 37°°C. The goat anti-mouse IgG peroxidase antibody (Sigma Aldrich) was added 1:10,000, and incubated at 37°C for 1 hour. Finally, after the same washing procedures, the reaction was determined by adding the TMB solution (Thermo Fisher, USA) and incubated at room temperature for 10 min. The ELISA reaction was stopped with a 1M HCl solution, and the absorbance was measured at 450 nm in an EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer). All
experiments were conducted in triplicate to ensure robustness and reliability of the results.

# Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Dunnet's multiple comparison test, according to the most recommended post-hoc test, using Prism 5.01 software (GraphPad Software). Differences were considered significant at values of p < 0.05 and data are expressed as the mean ±SD of at least three independent experiments (n=3), performed in triplicate.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

## **3D** cultures characterization

We successfully bioprinted a 3D human reconstructed skin using established protocols<sup>14,15</sup>, which resulted in a well-defined, robust skin equivalent with a cohesive barrier and distinct layers of dermis, epidermis, and stratum corneum, as shown in histological evaluation (Figure 1A). Skin immunofluorescence images revealed that the tissue had matured after 10 days of differentiation, as indicated by the presence of Hyaluronic acid synthetase (Has-2), cytokeratin-10 (CK-10), involucrin production (Figure 1B), and permeability assay through time was also assessed (Figure 1C), indicating a functional bioprinted tissue <sup>22,53</sup>.



**Figure 1.** Microscopy images of human skin equivalent. **A)** Morphological images of HSE, the cross sections stained with Hematoxylin, and Eosin shows the differentiated layers of HSE in 10x, and 40x increase, scale bars: 200  $\mu$ m, and 50  $\mu$ m. **B)** Immunofluorescence of HSE, showing the differentiation markers cytokeratin -10 (CK-10) (red), involucrin (green) and hyaluronic acid synthase -2 (HAS-2) (yellow). **C)** Apparent permeability curve of skin equivalent.

Similarly, we biofabricated the intestinal barrier (BI) equivalent using established protocols<sup>18</sup>, its characterization exhibited the expected shape, format, robustness, resistance, and the cohesiveness (Figure 2). The transepithelial electrical resistance (TEER) measurements showed increased values that stabilized during the final tissue differentiation<sup>19,20,54</sup>, indicating a robust barrier (Figure 2A). The MTT and CellTiter assays showed high tissue viability for up to 21 days of differentiation (Figure 2B and C), at which point the equivalents were transferred to Chip3 devices to integrate the MPS.



**Figure 2**. Characterization of intestinal barrier equivalent. **A)** Transepithelial electrical resistance (TEER) ( $\Omega$ .cm<sup>2</sup>) measured each 3 days during the differentiation process. **B)** Tissue viability over 35 days of cultivation assessed using MTT assay. **C)** Tissue viability regarding ATP production measured during the differentiation process. **D)** Apparent permeability of skin equivalent. **E)** Normalized relative expression of SLC5A1, ATP1A1, ABCB1, TJP1, MUC2 and CLDN2 genes at different times of the intestinal equivalents' differentiation stage. Values that are statistically significant (1-way ANOVA or t-test, p < 0.05) compared to control are indicated with asterisks. **F)** 20x magnification of a 5 µm section of the intestinal barrier equivalent stained with Haematoxylin and Eosin on the 21st day of cell differentiation; 20x magnification of a 5 µm section of the nucleus in red; **G)** Superior view of intestinal barrier equivalent at 40x magnification after staining with DAPI and phalloidin

for staining the nucleus (blue) and cytoskeleton (red) in day 7 and 21 of differentiation; Superior view of intestinal barrier equivalent at 40x magnification after staining with DAPI and occludin for staining the nucleus (blue) and tight junctions (green) in day 7 and 21 of differentiation. **H)** Electronic microscopy of intestinal barrier. Arrows suggests the presence of mucus on the top of the microvilli. Values that are statistically significant (p < 0.05, 1-way ANOVA or t-test) different compared to control are denoted with asterisks.

Permeability of the intestinal barrier was increased in time, as expected<sup>24</sup> (Figure 2D). Gene expression of classical intestinal markers related to specific membrane transporters (glucose, ions, and drugs), receptors, protein of adhesion and mucus production showed increasing expression of SLC5A1, ATP1A1, ABCB1, MUC2 and CLDN2 during the differentiation, indicating a well-formed functional intestinal barrier equivalent (Figure 2E). Histology and optical microscopy analysis demonstrated that the barrier is cohesive and well formed, with juxtaposed cells forming the epithelial layer, and showing mucus production (Figure 2F). This cohesiveness was also evaluated by immunofluorescence, through phalloidin and occludin labeling during barrier differentiation at day 7 and 21 (Figure 2G). The results show an increase in cytoplasmic and occludin labeling, indicating an improvement in barrier robustness and cell adhesion at the end of the differentiation period. Finally, SEM analysis yielded (Figure 2H) a visual revelation of microvilli on the cell surface, further supporting the observations made during intestinal barrier differentiation. These microvilli, in conjunction with the appearance of mucus over the differentiation period (as illustrated in Figure 2F), underscore the comprehensive transformation and maturation of the intestinal equivalent.

Liver equivalents exhibited well-formed, functional, and robust spheroids shape, without necrotic centers. These spheroids presented average size between, indicating reproducibility of size (Figure 3A), high tissue viability for up to 21 days of spheroid formation, which were evaluated by MTT and CellTiter assays (Figures 2 B and C).

To evaluate spheroid's functionality, we assessed their metabolic levels by measuring glucose, triglycerides, and cholesterol in the cell culture media, which remained stable during the 21-day cultivation period (Figure 2D). Besides this, we also checked the expression of functionality markers of liver spheroids through qPCR and monitoring expression of CYP3A4, BSEP, ALB, PPARA, FTL and FTH1 in the time after spheroid formation. The CYP3A4 gene encodes an enzyme related to detoxification related to liver metabolism and detoxification <sup>47,55</sup>, the BSEP is related to the main canalicular bile salt export pump in humans<sup>47,55</sup>, ALB gene encodes a essentially produced protein in the liver and, therefore, its expression is related to the functionality of this organ<sup>47,55</sup>. The PPARA is related to lipid metabolism<sup>47</sup>, and FTL and FTH1 coded for heavy and light chain of ferritin, responsible for iron storage<sup>47</sup>. Gene expression analysis showed that the spheroids present upregulation of CYP3A4, BSEP, ALB, PPARA, and FTL expression over time (Figure 2 E). These results suggest the spheroids functionality, specifically for albumin, due to the reported correlation of albumin mRNA expression in human liver and serum albumin concentration<sup>56,57</sup>; and for CYP3A4, due to the reported correlation between CYP3A4 protein, its activity and mRNA levels<sup>58</sup>.



Figure 3. Characterization of liver equivalents. A) Light microscopy of a liver spheroid in an ultra-low attachment plate and size measurement using High Content Imaging.
B) Liver equivalents' viability over 21 days of cultivation assessed using MTT assay.
C) Tissue viability regarding ATP production measured during the differentiation

process. **D)** Triglycerides, cholesterol, and glucose levels assessed every 7 days of cultivation for 21 days. **E)** Normalized relative gene expression of CYP3A4, BSEP, ALB, PPARA, FTL and FTH1 analysed in 3 replicates of liver equivalents in different moments of cell culture after spheroids biofabrication. **F)** 20x magnification of a histological section of liver spheroid stained with Haematoxylin and Eosin; Hepatic spheroid at 20x magnification with the nucleus stained in blue (DAPI), the cytoskeleton in red (rhodamine/phalloidin) and the endoplasmic reticulum in green (CYP3A4). Values that are statistically significant (p < 0.05, 1-way ANOVA or t-test) different compared to control are denoted with asterisks

Histological analysis confirmed the spherical, well-formed aggregates with intact borders, with the expected hepatocyte and stellate cell morphology. DAPI and Rhodamine/Phalloidin staining revealed a cohesive and integral spheroid structure without necrotic centers, while the presence of CYP3A4 indicated a functional organ equivalent (Figure 3F). Overall, these results demonstrate the successful manufacture of functional 3D tissue equivalents using established protocols.

# Dose selection of model substances

To assess toxicity and carcinogenicity endpoints, we treat isolate cultures of fibroblasts, and of keratinocytes, with different doses of acetaminophen (from 0.02 to 20000  $\mu$ M) and formaldehyde (from 0.02 to 20000  $\mu$ M), respectively, and performed viability assays. We observed that acetaminophen did not influence HaCaT and fibroblasts viability until 2000  $\mu$ M. For formaldehyde, viable concentrations for HaCaT were 200  $\mu$ M, and 2000  $\mu$ M for fibroblasts (Supplementary Figure 1A and B). In addition, we search in literature treatment doses for these cell types and that did not promote toxicity<sup>35,59–61</sup>. As our treatment would be performed in reconstituted skin, we used 5-10 times higher doses than those used in monolayer cultures, due to the skin 3D structure, which is more resistant and robust than monolayer cultures. Using toxicity results from fibroblasts, and keratinocytes, we selected non-toxic doses and increased them to 5x, predicting their dermal absorption using CDC Skin Permeation Calculator, and found that they were all dermally absorbed and able to reach other organ equivalents in the MPS.

After that, we selected doses of 3.75 mM for acetaminophen and 60 µM for formaldehyde and used them to treat liver spheroids to observe their viability and potential to modulate gene expression and assess systemic toxicity and carcinogenicity, respectively. For systemic toxicity, we evaluated GSTA2, UGT1A1,

and CYP3A4, all important markers for detoxification. We observed higher expression in acetaminophen treated spheroids compared to negative control, as expected <sup>58,62–65</sup>. Particularly for CYP3A4, this behavior was related to toxicity caused by acetaminophen in HepG2 cells cultivated in different ways. Moreover, the effects of acetaminophen were related not only to the increase in mRNA levels of CYP3A4, but also to its activity since the levels of CYP3A4 mRNA were correlated to the level of CYP3A4 protein and activity <sup>53</sup>. To assess carcinogenicity, we evaluated protooncogenes AKT1, MET, and MAPK1, which become oncogenes when activated and transform normal cells into cancerous cells. We observed overexpression in formaldehyde treated spheroids compared to negative control and decrease in cell viability after the treatments (Supplementary Figure 1C-E). Once tissue equivalents were developed and characterized, and substances and doses to be tested were defined, we integrated the equivalents into microfluidic devices and utilized designed genetic panels to assess toxicological endpoints with microphysiological systems.

# Microphysiological system assembly and treatment

To set up our MPS system, we positioned the bioprinted 3D skin, in which the topical treatment was applied, in the central compartment of the microfluidic device. In the smaller compartment, we placed twenty liver spheroids, while the other larger compartment held the intestinal barrier equivalent. This arrangement followed the physiological flow direction, by setting the flow to circle clockwise, allowing the absorbed substance through skin to reach the liver compartment for metabolism before reaching the intestinal compartment (Figure 4).



**Figure 4**. Bottom view of HUMIMIC Chip3plus containing the intestinal barrier equivalent (left), 3D skin equivalent (center) and liver spheroids (right). The arrows indicate the flow direction.

The impact of flow on intestinal barrier viability and functionality was evaluated by gene expression through the comparison of tissues inside and outside the microfluidic devices under MPS experimental conditions, without any treatment (Figure 5A). The results showed that although the analyzed genes were expressed in both conditions, the applied flow had an impact on their expression. SLC5A1 and TJP1 were more highly expressed in the static condition, indicating that flow might affect glucose transport and tight junctions. However, ATP1A1, MUC2, and CLDN2 were significantly more expressed under flow, suggesting that continuous flow could improve the physiological conditions of this 3D culture. The viability of these equivalents was not affected by dynamic condition.

The same comparison was performed to assess liver functionality in MPS (Figure 5B). The results showed that genes were expressed in both conditions, but flow affected some of them. CYP3A4 expression was higher in the presence of flow, indicating that xenobiotic metabolism was more active in the microphysiological condition. However, BSEP and ALB were more expressed in the static condition, indicating that flow affected the expression of proteins responsible for biliary salt transport and ALB, one of the most abundant proteins in this organ. These findings suggest that the microphysiological environment may cause some cell perturbations, such as cell leaching due to flow, but these perturbations did not affect the viability of the cultures.



**Figure 5**. Comparison of gene expression and viability of organ equivalents cultured under static or dynamic conditions. **A)** Normalized relative expression of SLC5A1, ATP1A1, ABCB1 TJP1, MUC2 and CLDN2 genes analyzed in intestinal barrier replicates statically cultured and subjected to flow when integrated into the microfluidic devices. **B)** Intestine equivalents' viability in static and dynamic conditions assessed using MTT assay. **C)** Normalized relative expression of CYP3A4, BSEP, ALB, PPARA, FTL and FTH1 genes analyzed in liver equivalents replicates statically cultured and other subjected to flow when integrated into the microfluidic devices. **D)** Liver equivalents' viability in static and dynamic conditions assessed using MTT assay. **E)** Normalized relative expression of KRT1, IVL and LORI genes analyzed in skin equivalents replicates statically cultured and other subjected to flow when integrated into the microfluidic devices. **F)** Skin equivalents' viability in static and dynamic conditions assessed using MTT assay. Values that are statistically significant (p < 0.05, 1-way ANOVA or t-test) different compared to control are denoted with asterisks.

For skin equivalents, the gene expression of tissues was also evaluated inside and outside the microfluidic devices to assess flux impact (Figure 5C). The genes are expressed in both conditions and flow affected mainly LORI (loricrin) expression, which is normally expressed in epidermis, at the cornified cell envelope, and represents a defensive or protective mechanism<sup>66</sup>. This finding suggests that dynamic condition may signalize to skin equivalent protection against flux, which did not impact tissue viability, since dynamic condition seems to improve tissues viability.

## Organ equivalents viability after treatment in the MPS

After setting up the MPS assay, the cultures were integrated into the chip and treatments were performed. To assess cell viability after treatment of the 3D skin with 3.75 mM acetaminophen and vehicle (culture medium) for 24 hours, an MTT assay was conducted for all organ equivalents. Results showed no effect on the cell viability of intestinal barrier, while the skin equivalent maintained a viability of around 80% and the liver spheroids viability decreased to around 60%, indicating that this dose of acetaminophen produced some systemic toxicity, but the organ equivalents remained viables (Figure 6A). In the MPS assay treated with 60 µM formaldehyde, the liver and intestinal equivalents showed high viability when treated with the test substance or vehicle. However, the 3D skin exhibited a viability of 60% after treatment with formaldehyde, indicating that this substance presented some toxicity to skin (Figure 6B).

We also evaluated the inflammatory scenario in the global culture media circulating in the three chambers of the microfluidic devices, by measuring the secretion of two cytokines, IL-1 and IL-6 through ELISA assay. Our results show that formaldehyde treatment increased the production of both cytokines, suggesting increased damage to the cultures, supporting the viability results (Figure 6 C and D). Gene expression of inflammatory genes is also highlighted in Supplementary figure 2.



**Figure 6.** Viability of organ equivalent after treatments and cytokine secretion after MPS treatment. **A)** Viability measurement (%) of 3D bioprinted skin equivalents, intestinal barriers, and liver spheroids after treatment with vehicle (control) and 3.75mM acetaminophen. **B)** Viability measurement (%) of 3D bioprinted skin equivalents, intestinal barriers, and liver spheroids after treatment with vehicle (control) and 60µM formaldehyde. **C)** Evaluation of IL-1 secreted in the culture media circulation in the Microphysiological device after the treatment of formaldehyde and acetaminophen, it is possible to observe that formaldehyde increased the circulating amount of IL-1 produced by the cultures. **D)** Evaluation of IL-6 secreted in the culture media circulating and acetaminophen, it is possible to observe that formaldehyde increased the circulating amount of IL-1 produced by the cultures. **D)** Evaluation of IL-6 secreted in the culture media circulating amount of IL-1 produced by the cultures. Values that are statistically significant (p < 0.05, 1-way ANOVA or t-test) different compared to control are denoted with asterisks.

#### Gene signatures analysis

To assess the viability of the chip-integrated 3D cultures, we conducted RNA extraction from liver spheroids, intestinal barrier, and skin equivalents following their integration into the microfluidic device. These integrated organ equivalents were then exposed to reference substances, under flow, to investigate modulation in gene expression induced by these well-known chemicals through panels specific to systemic toxicity and carcinogenicity. Real-time quantitative PCR (qPCR) was employed to analyze gene expression in the integrated equivalents within the MPS following topical treatment of the skin. The respective biological material and gene panels were utilized for this purpose. All the key genes evaluated in both investigated endpoints are listed in Supplementary Figure 1. The expression profiles of each chip-integrated 3D cultures are presented in the heatmaps (Figure 7A and 8A). By examining the gene expression profiles and their associated pathways (Figures 7 and 8, Supplementary Table 2), we support our model potential to assess toxicity of chemicals, due to the effects of these well-known chemicals in the microphysiological system.

Acute systemic toxicity endpoint – The heatmap in Figure 7A, show the modulation of the evaluated genes after acetaminophen treatment in liver and intestinal barrier. In this endpoint we did not investigate gene expression in skin equivalent since we aimed to observe systemic toxicity events after topical treatment, and in our model setup the skin was used as the entry and absorption barrier for the acetaminophen treatment.

Interestingly, the treatment with 3.75 mM acetaminophen predominantly induced gene expression modulation in the liver equivalents<sup>18,35</sup>, and intestinal barrier. Specifically, following topical treatment of the MPS with acetaminophen, genes associated with liver toxicity, inflammation, hepatic steatosis, hepatic cholestasis, and hepatic metabolism showed significant modulation in these liver equivalents. It is possible to observe upregulation of AFP, ALB, APOE, FABP1, GPT, GSTA1, and SSP1, genes associated with liver toxicity after acetaminophen treatment<sup>55,67–71</sup>. In addition, inflammation-related genes (CCL5 and LCN2), genes related to hepatic steatosis (MLXIPL), hepatic cholestasis (NR1H4), and hepatic metabolism (CYP3A4 and SULT2A1) were also upregulated in these liver equivalents after the topical treatment with acetaminophen <sup>55,72–75</sup>.

Similar observations were made in the intestinal equivalent, where genes associated with toxicity in the intestine presented modulation after treatment with acetaminophen<sup>33</sup>. Genes such as CFD and MIR215, related to intestinal toxicity, exhibited a slight increase in expression. Modulation was also observed in genes involved in intestinal brush border structures (ALPI and SI), tight junctions (TJP1, TJP3, and CLDN1), and inflammation (CXCL8 and TNF). Additionally, the expression of intestinal transporters (SLC22A1) was also modulated <sup>55,76–78</sup>.

Concerning production of inflammatory cytokines by each evaluated 3D culture, we observed modulation of CCL5, CD44, CXCL8, IL-6, LCN2 and TNF-α in skin, liver, and in intestinal barrier<sup>78,79</sup>. We noted upregulation of CCL5, CD44, and TNF in the skin<sup>80,81</sup>, CCL5 and LCN2 in the liver<sup>72,73</sup>, and CXCL8, IL-6, and TNF in the intestinal barrier after acetaminophen treatment<sup>77</sup>. These results indicate that acetaminophen treatment modulated different pathways depending on the tissue, and that the effect of the treatment corroborates previous reports (Supplementary Figure 2A). Additionally, these findings suggest an increased inflammatory environment, with direct activation of skin irritation cascades in response to acetaminophen treatment.



Figure 7. Genes and biological toxicity pathways modulated in the liver and intestine equivalents after MPS treatment with 3.75 mM acetaminophen. A) Heatmap of systemic toxicity gene panel modulation in liver and intestine equivalents after

acetaminophen treatment. Foldchange of gene expression normalized to control. **B)** Illustration of acetaminophen metabolism pathway, which is within Xenobiotic metabolism pathways listed by IPA analysis. **C)** Illustration of bile acid biosynthetic process related pathways which is within FXR activation pathway listed by IPA analysis.

To gain further insights into the underlying biological mechanisms, biological pathway analysis was performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA)<sup>44</sup>, an application suitable to analyze multi-OMICs data. The analysis shed light on the molecular pathways involved in the modulation of the gene signature panel. Notably, the metabolism of acetaminophen was found to be activated, as evidenced by the overexpression of genes such as CYP3A4 and SULT2A1 (Figure 7B)<sup>55,72,74,75,82</sup>, inducing hepatotoxicity. Additionally, pathways associated with bile acid biosynthesis, which are directly linked to hepatic cholestasis, exhibited modulation (Figure 7C)<sup>75,83–85</sup>. Our analysis also revealed the modulation of other signaling pathways related to xenobiotic metabolism, including "PXR signaling pathway" and "FXR signaling pathway," as indicated by IPA analysis. Moreover, this analysis listed the main diseases, disorders and toxicological functions that might be induced by acetaminophen under the markers presented in our gene panel (Supplementary Table 2).

Considering intestinal barrier, the gastrointestinal disease was the main disorder in which the modulated genes were involved. These findings indicate that the proposed model effectively assesses the potential for systemic toxicity, as topical treatment on the skin equivalent impacted the other organ equivalents within the MPS. All these results are consistent with results reported by OECD animal testing data. Besides in these data, no epidermal and dermal studies were reported for acetaminophen, the hepatotoxicity was detected for oral treatments<sup>32,40</sup>.

Carcinogenicity endpoint – Moving on to carcinogenicity assessment, we investigated the toxicological potential of formaldehyde in the three organ equivalents of the MPS model (Figure 8). The heatmaps show that treatment with formaldehyde in the skin equivalent resulted in upregulation of genes associated with cell proliferation, including CCNE1, CCND1, SAV1, JAK2, STAT5A, JAG1, MDM2, and ERBB2. Notably, JAG1, ERBB2, and MDM2 are also implicated in increased cell survival, a characteristic of tumor development <sup>86–91</sup>. Furthermore, genes related to angiogenesis <sup>91,92</sup>, such as VEGFA and VEGFB, exhibited elevated expression in the 3D bioprinted skin after formaldehyde treatment (Figure 8A). In terms of inflammatory responses, it

is possible to observe that formaldehyde promoted modulation of cytokines in the three chip-integrated 3D cultures. Its promoted upregulation of CD44 and NFKB1 in the skin, IL-6 in the intestinal barrier, and NFKB1 in the liver, also suggesting an increased inflammatory response after treatment, which was particular for each type of 3D culture testes in our MPS, also indicating skin irritation (Supplementary Figure 2B).



Figure 8. Genes and cancer signaling pathways modulated in the organ equivalents after MPS treatment with 60  $\mu$ M formaldehyde. A) Heatmap of carcinogenicity gene panel modulation in skin, liver, and intestine equivalents after

formaldehyde treatment. Foldchange of gene expression normalized to control. **B)** Illustration of signaling pathways modulated in skin cancer. **C)** Illustration of signaling pathways modulated in hepatic cancer. **D)** Illustration of signaling pathways modulated in colorectal cancer.

IPA analysis showed "Molecular mechanisms of cancer" as one of the main modulated pathways for this equivalent, been cancer the main disease/disorder pointed. Activation of pathways involved in skin cancer development and progression was also observed in the skin equivalent following exposure to formaldehyde (Figure 8B). These findings provide insights into the potential carcinogenic effects of formaldehyde in the context of the skin organ equivalent within the MPS model.

Formaldehyde treatment also influenced gene expression in liver equivalents, impacting key cancer pathways such as PI3K-AKT-mTOR, Ras-Raf-MAPK, and Notch. These pathways are vital for signaling, metabolism, angiogenesis, survival, invasion, and other cancer characteristics <sup>88,89,91,93</sup>. Additionally, activation of hepatocellular carcinoma-related pathways was also observed in hepatic spheroids following topical formaldehyde treatment (Figure 8C). Similarly, formaldehyde treatment affected gene expression in the intestinal barrier equivalent, including HIF1A (hypoxia), IL6 (inflammation), KIT (proliferation and survival), and TWIST1 (metastasis)<sup>91</sup>. Analysis using Ingenuity Pathway Analysis software revealed modulation of canonical cancer pathways in the intestinal barrier equivalent, linked to colorectal cancer occurrence (Figure 8D).

Overall, these data demonstrated that formaldehyde exposure impacts genes involved in key cancer-related biological processes in organ equivalents within the MPS. Besides, reliable studies on formaldehyde repeated dermal dose toxicity following current guidelines were not reported, it's important to note that this substance has a harmonized classification as Carc 1B, indicating its carcinogenic potential for humans, based on animal evidence. It is also classified as a Group 1 carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC)<sup>43</sup>. These findings indicate that our proposed model has potential for assessing the carcinogenicity potential of chemicals in different organs.

## CONCLUSIONS

In this study, we successfully developed and characterized 3D skin, intestinal barrier, and liver equivalents with remarkable robustness, integrity, viability, and functionality. To access these results, we first biofabricated human equivalents of liver, skin, and intestinal barrier, which were deeply characterized to show functionality. These organ equivalents were then integrated into a microfluidic device (HUMIMIC Chip3plus), creating a microphysiological system that faithfully replicates human physiology, including organ connections and blood circulation. This system was designed specifically to evaluate the systemic toxicity and carcinogenicity of ingredients applied topically, nevertheless other important questions can be answered using the same model and applying other relevant genic panels during analysis. Our three-organ equivalent MPS exemplifies versatility, rendering it capable of evaluating both oral and topical absorption scenarios with proficiency. For topical applications, our MPS empowers us to assess toxicity not only within the liver, but also across the intestinal barrier. While traditionally the intestinal barrier might not be the primary organ examined for topical toxicity, our findings underscore the valuable insights that can be gleaned from the intestinal barrier in response to topical treatments. Furthermore, our system enables direct comparisons of the endpoints induced by the same substance when administered orally versus topically, facilitating informed choices for optimal compound delivery methods.

Compared to traditional in vitro static culture models, our proposed model offers a more physiological representation of human biology, allowing for a more accurate assessment of the potential effects of chemical ingredients. To evaluate the efficacy of our model, we tested two genic panels containing gene signatures of the main biomarkers associated with the biological processes relevant to each toxicological endpoint. By measuring the modulation of gene expression in each organ equivalent, after topical treatment with two well-known toxicants, we were able to demonstrate the model's effectiveness.

In summary, here we are proposing a new NAM model that will add to this new range of tests that have been applied in MPS by cosmetic industries in the context of safety assessment, specially applied to toxicological endpoints, but which have different configurations and purposes. Our results offer compelling evidence of this model's capability to accurately assess the acute systemic toxicity and carcinogenicity effects of ingredients. Overall, while our model provides more relevant data to human responses, animal testing data for the tested substances, acetaminophen, and formaldehyde, already reported their toxic effects. The implications of our MPS model extend not only to the cosmetics industry, but also for food, pharmaceutical, and agrochemical industries, where it can play a vital role in the development of new ingredients to evaluate their toxicological potential, particularly when dealing with unpublished molecules lacking available data <sup>12,94</sup>. As future perspectives, additional tests using different reference substances that act through diverse biological mechanisms should be conducted to comprehensively evaluate the model's robustness. Furthermore, in vitro to in vivo extrapolation should be applied to determine human-relevant doses, aiming to establish a reliable point of departure that, through a weight of evidence approach, can be integrated into the risk assessment process to ensure consumer safety.

#### REFERENCES

1 G. J. Nohynek, E. Antignac, T. Re and H. Toutain, Toxicol Appl Pharmacol, 2010.

2 J. Klein, Transnational Law & Contemporary Problems, 2012, 21, 252–275.

3 M. Dent, R. T. Amaral, P. A. Da Silva, J. Ansell, F. Boisleve, M. Hatao, A. Hirose, Y. Kasai, P. Kern, R. Kreiling, S. Milstein, B. Montemayor, J. Oliveira, A. Richarz, R. Taalman, E. Vaillancourt, R. Verma, N. V. O. R. C. Posada, C. Weiss and H. Kojima, Computational Toxicology, DOI:10.1016/j.comtox.2018.06.001.

4 SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 12 th revision, 2023.

5 J. Hemmerich and G. F. Ecker, Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci, 2020, 10.

6 Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD, 2018.

7 I. Wagner, E.-M. Materne, S. Brincker, U. Süßbier, C. Frädrich, M. Busek, F. Sonntag, D. A. Sakharov, E. V. Trushkin, A. G. Tonevitsky, R. Lauster and U. Marx, Lab Chip, , DOI:10.1039/c3lc50234a.

8 S. Ishida, Frontiers in Toxicology, 2021, 3.

9 D. G. Rudmann, Toxicol Pathol, 2019, 47.

10 S. Brescia, C. Alexander-White, H. Li and A. Cayley, Toxicol Res (Camb), , DOI:10.1093/toxres/tfac087.

11 R. J. Silva and S. Tamburic, Cosmetics, 2022, 9.

12 T. P. Tao, I. Maschmeyer, E. L. LeCluyse, E. Rogers, K. Brandmair, S. Gerlach, J. Przibilla, F. Kern, C. Genies, C. Jacques, A. Najjar, A. Schepky, U. Marx, J. Kühnl and N. J. Hewitt, Front Pharmacol, , DOI:10.3389/fphar.2023.1076254.

13 TissUse GmbH, HUMIMIC Chip3 und HUMIMIC Chip3plus, https://www.tissuse.com/en/humimic/chips/humimicchip3/.

14 T. do Nascimento Pedrosa, C. M. Catarino, P. C. Pennacchi, S. B. de Moraes Barros and S. S. Maria-Engler, in Methods in Molecular Biology, 2021, vol. 2240.

15 A. Millás, J. Lago, L. Vasquez-Pinto, P. Massaguer and S. S. Maria-Engler, International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB, , DOI:10.25061/2595-3931/ijamb/2019.v2i1.24.

16 T. M. Achilli, J. Meyer and J. R. Morgan, Expert Opin Biol Ther, 2012, 12.

17 A. P. Napolitano, D. M. Dean, A. J. Man, J. Youssef, D. N. Ho, A. P. Rago, M. P. Lech and J. R. Morgan, Biotechniques, , DOI:10.2144/000112591.

18 T. M. Marin, N. de Carvalho Indolfo, S. A. Rocco, F. L. Basei, M. de Carvalho, K. de Almeida Gonçalves and E. Pagani, Chem Biol Interact, , DOI:10.1016/j.cbi.2018.11.010.

19 E. Le Ferrec, C. Chesne, P. Artusson, D. Brayden, G. Fabre, P. Gires, F. Guillou, M. Rousset, W. Rubas and M.-L. Scarino, Alternatives to Laboratory Animals, , DOI:10.1177/026119290102900604.

20 V. Gupta, N. Doshi and S. Mitragotri, PLoS One, , DOI:10.1371/journal.pone.0057136.

21 B. Sarmento, F. Andrade, S. B. Da Silva, F. Rodrigues, J. Das Neves and D. Ferreira, Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012, 8.

22 F. F. Schmidt, S. Nowakowski and P. J. Kluger, Front Bioeng Biotechnol, , DOI:10.3389/fbioe.2020.00388.

23 C. Sampias and G. Rolls, Leica Biosystems.

24 M. H. Macedo, E. Martínez, C. C. Barrias and B. Sarmento, Front Bioeng Biotechnol, , DOI:10.3389/fbioe.2020.524018.

25 D. Fanni, M. Manchia, F. Lai, C. Gerosa, R. Ambu and G. Faa, European Journal of Histochemistry, , DOI:10.4081/ejh.2016.2614.

26 R. Al-Sadi, K. Khatib, S. Guo, D. Ye, M. Youssef and T. Ma, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, , DOI:10.1152/ajpgi.00055.2011.

27 A. S. Borowiec, P. Delcourt, E. Dewailly and G. Bidaux, PLoS One, , DOI:10.1371/journal.pone.0077507.

28 L. Hämäläinen, E. Kärkkäinen, P. Takabe, L. Rauhala, G. Bart, R. Kärnä, S. Pasonen-Seppänen, S. Oikari, M. I. Tammi and R. H. Tammi, British Journal of Dermatology, DOI:10.1111/bjd.16423.

29 Y. Wang, M. E. Lauer, S. An, J. A. Mack and E. V. Maytin, Journal of Biological Chemistry, DOI:10.1074/jbc.M114.578377.

30 C. M. A. Reijnders, A. Van Lier, S. Roffel, D. Kramer, R. J. Scheper and S. Gibbs, Tissue Eng Part A, , DOI:10.1089/ten.tea.2015.0139.

31 K. J. Livak and T. D. Schmittgen, Methods, , DOI:10.1006/meth.2001.1262.

32 ECHA, Paracetamol Registration Dossier, https://echa.europa.eu/pt/registrationdossier/- /registered-dossier/12532.

33 J. R. Mitchell, D. J. Jollow, W. Z. Potter, J. R. Gillette and B. B. Brodie, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, , DOI:10.1007/s10800-014-0707-x.

34 Y. Xie, M. R. McGill, K. Dorko, S. C. Kumer, T. M. Schmitt, J. Forster and H. Jaeschke, Toxicol Appl Pharmacol, , DOI:10.1016/j.taap.2014.05.010.

35 R. M. Rodrigues, O. Govaere, T. Roskams, T. Vanhaecke, V. Rogiers and J. De Kock, Data Brief, , DOI:10.1016/j.dib.2016.03.069.

36 M. J. Hodgman and A. R. Garrard, Crit Care Clin, 2012.

37 K. S. Albert, A. J. Sedman and J. G. Wagner, J Pharmacokinet Biopharm, , DOI:10.1007/BF01071309.

38 C. I. Ghanem, A. Arias, A. Novak, G. D. Carpini, S. Villanueva, A. G. Blazquez, J. J. G. Marin, A. D. Mottino and M. C. Rubio, Biochem Pharmacol, , DOI:10.1016/j.bcp.2010.10.006. 39 C. Schäfer, K. R. Schöder, O. Höglinger, S. Tollabimazraehno and M. R. Lornejad-Sch??fer, Cellular Physiology and Biochemistry, , DOI:10.1159/000354449.

40 IARC, Paracetamol (acetaminophen) - IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 50, https://publications.iarc.fr/68, (accessed 13 September 2023).

41 PubChem, Formaldehyde, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/712.

42 ECHA, Formaldehyde Registration Dossier, https://echa.europa.eu/pt/registrationdossier/- /registered-dossier/15858.

43 IARC, FORMALDEHYDE - IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 88, https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/IarcMonographs-On-The-Identification-Of-CarcinogenicHazards-To-Humans/Formaldehyde-2-Butoxyethanol-And1--Em-Tert-Em--Butoxypropan-2-ol-2006, (accessed 13 September 2023).

44 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Finite Dose Skin Permeation Calculator, https://www.cdc.gov/niosh/topics/skin/finiteskinpermcalc. html.

45 P. Joseph, Food and Chemical Toxicology, , DOI:10.1016/j.fct.2017.07.031.

46 Thermo Fisher Scientific, TaqMan Array Plates for Gene Expression Analysis, <u>https://www.thermofisher.com/br/en/home/lifescience/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-</u> <u>assays/taqmangene-expression/96-well-taqman-gene-expressionassays.html</u>.

47 Weizmann Institute of Science; LifeMap Sciences, GeneCards: The Human Gene Database, <u>https://www.genecards.org/</u>.

48 C. J. Mattingly, M. C. Rosenstein, G. T. Colby, J. N. Forrest and J. L. Boyer, in Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2006, vol. 305.

49 Yale University School of Medicine, Comparative Toxicogenomics Database, <u>http://www.ctdbase.org/</u>.

50 Knut & Alice Wallenberg Foundation, THE HUMAN PROTEIN ATLAS, <u>https://www.proteinatlas.org/</u>.

51 Thermo Fisher Scientific, Expression Suite Software, https://www.thermofisher.com/br/en/home/technicalresources/softwaredownloads/expressionsuitesoftware.html.

52 K. Schimek, S. Frentzel, K. Luettich, D. Bovard, I. Rütschle, L. Boden, F. Rambo, H. Erfurth, E. M. Dehne, A. Winter, U. Marx and J. Hoeng, Sci Rep, , DOI:10.1038/s41598-020- 64219-6.

53 N. Ono, T. libuchi, H. Todo, S. Itakura, H. Adachi and K. Sugibayashi, European Journal of Pharmaceutical Sciences, , DOI:10.1016/j.ejps.2021.106096.

54 B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler and J. J. Hickman, J Lab Autom, 2015, 20.

55 R. C. Gupta, Biomarkers in Toxicology, 2014.

56 I. Ozaki, M. Motomura, Y. Setoguchi, N. Fujio, K. Yamamoto, T. Kariya and T. Sakai, Gastroenterol Jpn, , DOI:10.1007/BF02782816.

57 M. Chojkier, J Clin Gastroenterol, 2005, 39.

58 M. Watanabe, T. Kumai, N. Matsumoto, M. Tanaka, S. Suzuki, T. Satoh and S. Kobayashi, J Pharmacol Sci, , DOI:10.1254/jphs.94.459.

59 C. J. Boreiko, D. B. Couch and J. A. Swenberg, in Genotoxic Effects of Airborne Agents, 1982.

60 E. Tyihák, J. Bocsi, F. Timár, G. Rácz and B. Szende, Cell Prolif, , DOI:10.1046/j.1365-2184.2001.00206.x.

61 G. Emri, D. Schaefer, B. Held, C. Herbst, W. Zieger, I. Horkay and C. Bayerl, Exp Dermatol, , DOI:10.1111/j.0906- 6705.2004.00157.x.

62 A. Trettin, A. Böhmer, M. T. Suchy, I. Probst, U. Staerk, D. O. Stichtenoth, J. C. Frölich and D. Tsikas, Oxid Med Cell Longev, , DOI:10.1155/2014/212576.

63 K. Nakamura, R. Mizutani, A. Sanbe, S. Enosawa, M. Kasahara, A. Nakagawa, Y. Ejiri, N. Murayama, Y. Miyamoto, T. Torii, S. Kusakawa, J. Yamauchi, M. Fukuda, H. Yamazaki and A. Tanoue, J Biosci Bioeng, , DOI:10.1016/j.jbiosc.2010.08.008.

64 Y. Y. Choi, J. I. Seok and D. S. Kim, Micromachines (Basel), , DOI:10.3390/mi11010036.

65 D. E. Feierman, Z. Melnikov and J. Zhang, Arch Biochem Biophys, , DOI:10.1006/abbi.2001.2677.

66 S. Nithya, T. Radhika and N. Jeddy, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 2015, 19.

67 I. Schuppe-Koistinen, Toxicol Lett, , DOI:10.1016/j.toxlet.2012.03.046.

68 SAFE-T consortium, The Drug induced liver injury work package of Innovative Medicines Initiative SAFE-T Consortium and The Hepatotoxicity Working Group of Critical Path Institutes PSTC, 2016.

69 D. E. Amacher, Hum Exp Toxicol, , DOI:10.1191/0960327102ht247oa.

70 L. Schnackenberg, X. Yang and Salminen, Curr Biomark Find, , DOI:10.2147/cbf.s27901.

71 S. Campion, J. Aubrecht, K. Boekelheide, D. W. Brewster, V. S. Vaidya, L. Anderson, D. Burt, E. Dere, K. Hwang, S. Pacheco, J. Saikumar, S. Schomaker, M. Sigman and F. Goodsaid, Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 9.

72 P. Godoy, N. J. Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J. G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Böttger, A. Braeuning, R. A. Budinsky, B. Burkhardt, N. R. Cameron, G. Camussi, C. S. Cho, Y. J. Choi, J. Craig Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M. T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K. S. Ferreira, V. Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C. E. P. Goldring, M. J. Gómez-Lechón, G. M. M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A. Hayward, D. Häussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H. G. Holzhütter, J. B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J. M. Kelm, B. Kevin Park, C. Kordes, G. A. Kullak-Ublick, E. L. Lecluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D. J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D. J. Naisbitt, A. K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. Pi, L. Pluta, S. A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E. H. K. Stelzer, B. Stieger, R. Stöber, Y. Sugiyama, C. Tetta, W. E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T. S. Weiss, A. Widera, C. G. Woods, J. J. Xu, K. M. Yarborough and J. G. Hengstler, Arch Toxicol, 2013, 87.

73 H. Ellinger-Ziegelbauer, M. Adler, A. Amberg, A. Brandenburg, J. J. Callanan, S. Connor, M. Fountoulakis, H Gmuender, A. Gruhler, P. Hewitt, M. Hodson, K. A. Matheis, D. McCarthy, M. Raschke, B. Riefke, C. S. Schmitt, M. Sieber, A. Sposny, L. Suter, B. Sweatman and A. Mally, Toxicol Appl Pharmacol, , DOI:10.1016/j.taap.2010.09.022

74 S. M. Orbach, R. R. Less, A. Kothari and P. Rajagopalan, ACS Biomater Sci Eng, 2017, 3.

75 E. A. G. Blomme, Y. Yang and J. F. Waring, Toxicol Lett, 2009, 186.

76 Y. Chen, Y. Lin, K. M. Davis, Q. Wang, J. Rnjak-Kovacina, C. Li, R. R. Isberg, C. A. Kumamoto, J. Mecsas and D. L. Kaplan, Sci Rep, , DOI:10.1038/srep13708.

77 L. R. Madden, T. V. Nguyen, S. Garcia-Mojica, V. Shah, A. V. Le, A. Peier, R. Visconti, E. M. Parker, S. C. Presnell, D. G. Nguyen and K. N. Retting, iScience, , DOI:10.1016/j.isci.2018.03.015.

78 J. M. Wells, R. J. Brummer, M. Derrien, T. T. MacDonald, F. Troost, P. D. Cani, V. Theodorou, J. Dekker, A. Méheust, W. M. De Vos, A. Mercenier, A. Nauta and C. L. GarciaRodenas, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 312.

79 M. N. Ajuebor and M. G. Swain, Immunology, 2002, 105.

80 N. Yasaka, M. Furue and K. Tamaki, Journal of Dermatology, , DOI:10.1111/j.1346-8138.1995.tb03349.x.

81 M. M. Bashir, M. R. Sharma and V. P. Werth, Arch Dermatol Res, 2009, 301.

82 F. Knöspel, F. Jacobs, N. Freyer, G. Damm, A. De Bondt, I. Van Den Wyngaert, J. Snoeys, M. Monshouwer, M. Richter, N. Strahl, D. Seehofer and K. Zeilinger, Int J Mol Sci, , DOI:10.3390/ijms17040584.

83 I. Evangelakos, J. Heeren, E. Verkade and F. Kuipers, Semin Immunopathol, 2021,43.

84 M. Stofan and G. L. Guo, Front Med (Lausanne), 2020, 7.

85 E. Gijbels and M. Vinken, Appl In Vitro Toxicol, , DOI:10.1089/aivt.2017.0027.

86 U. Asghar, A. K. Witkiewicz, N. C. Turner and E. S. Knudsen, Nat Rev Drug Discov, 2015, 14.

87 F. Sanchez-Vega, M. Mina, J. Armenia, W. K. Chatila, et al, Cell, , DOI:10.1016/j.cell.2018.03.035.

88 X. Yuan, H. Wu, H. Xu, H. Xiong, Q. Chu, S. Yu, G. S. Wu and K. Wu, Cancer Lett, 2015, 369.

89 A. S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath and W. Kolch, Oncogene, 2007, 26

90 E. Witsch, M. Sela and Y. Yarden, Physiology, 2010, 25.

91 D. Hanahan and R. A. Weinberg, Cell, 2011, 144.

92 D. J. Hicklin and L. M. Ellis, Journal of Clinical Oncology, 2005, 23.

93 B. D. Manning and A. Toker, Cell, 2017, 169.

94 J. Kühnl, T. P. Tao, K. Brandmair, S. Gerlach, T. Rings, U. Müller-Vieira, J. Przibilla, C. Genies, C. Jaques-Jamin, A. Schepky, U. Marx, N. J. Hewitt and I. Maschmeyer, Toxicology, , DOI:10.1016/j.tox.2020.152637.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary Figure 1. A) Cell viability of HaCaT and fibroblasts after treatment with different doses of

Acetaminophen. **B)** Cell viability of HaCaT and fibroblasts after treatment with different doses of formaldehyde. **C)** Normalized relative expression of systemic toxicity marker genes in liver spheroids after

treatment with 3.75 mM acetaminophen. **D)** Normalized relative expression of carcinogenicity marker genes in liver spheroids after treatment with 60  $\mu$ M formaldehyde. **E)** Liver equivalents viability after treatment with acetaminophen 3.75 mM and formaldehyde 60  $\mu$ M assessed using MTT assay.

**Supplementary Table 1.** List of the main genes evaluated in our genic panel. **A)** List of genes for systemic toxicity panel. **B)** List of genes for carcinogenicity panel.

Systemic toxicity gene signature	
Gene	Name
AFP	Alpha-fetoprotein
ALB	Albumin
ALPI	Alkaline phosphatase, intestinal
ALPL	Alkaline phosphatase
APOE	Apolipoprotein E
CCL5	C-C Motif Chemokine Ligand 5
CFD	Complement factor D
CLDN1	Claudin 1
CXCL16	C-X-C motif chemokine ligand 16
CXCL8	Interleukin-8
CYP2E1	Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1
CYP3A4	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4
FABP1	Liver fatty acid binding protein 1
GPT	Glutamic-pyruvic transaminase
GSTA1	Glutathione S-transferase alpha 1
LCN2	Lipocalin 2
MIR215	MicroRNA 215
MLXIPL	MLX Interacting Protein Like
NR1H3	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3
NR1H4	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4
NT5E	5'-nucleotidase ecto
SI	Sucrase-isomaltase
SLC22A1	Solute carrier family 22 member 1
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
SREBF1	Sterol response element binding protein 1c
SULT2A1	Sulfotransferase Family 2A Member 1
TJP1	Tight Junction Protein 1
TJP3	Tight junction protein 3
TNF	Tumor necrosis factor
UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4

В

А

Carcinogenicity gene signature		
Gene	Name	
AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1	
AKT2	AKT Serine/Threonine Kinase 2	
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator	
CCND1	Cyclin D1	
CCNE1	Cyclin E1	
ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha	
IL6	Interleukin 6	
JAG1	Jagged canonical Notch ligand 1	
JAK2	Janus kinase 2	
JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1Transcription Factor Subunit	
KIT	KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase	
MDM2	MDM2 Proto-Oncogene	
MTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase	
RICTOR	RPTOR Independent Companion Of MTOR Complex 2	
RPTOR	Regulatory Associated Protein Of MTOR Complex 1	
STAT5A	Signal transducers and activators of transcription 5A	
TWIST1	Twist family bHLH transcription factor 1	
VEGFA	Vascular endothelial growth factor-A	
YAP1	Yes associated protein 1	



**Supplementary Figure 2.** Modulation of inflammatory genes after treatment in the MPS. **A)** Expression of CCL5, CD44, CXCL8, IL-6, LCN-2 and TNF- $\alpha$ , in skin, liver and intestinal barrier equivalents after treatment with acetaminophen. **B)** Expression of CD44, IL-6 and NFKB1 in skin, liver and intestinal barrier equivalents after formaldehyde treatment.

**Supplementary Table 2.** IPA analysis show the main biological processes modulated by gene expression evaluation. At left, the top canonical pathways, diseases and toxicological functions found after acetaminophen treatment. At right, the top canonical pathways, diseases, biological functions and toxicological functions found after formaldehyde treatment. Considering intestinal barrier, the gastrointestinal disease was the main disorder in which the genes modulated in our panel were involved. These findings indicate that the proposed model effectively assesses the potential for systemic toxicity, as topical treatment on the skin equivalent impacted the other organ equivalents within the MPS.

Α	
	Systemic toxicity top canonical pathways
	Xenobiotic Metabolism Signaling
	PXR/RXR activation
	FXF/RXR activation
	Hepatic cholestasis
	Systemic toxicity top diseases and disorders
	Gastrointestinal disease
	Hepatic system disease
	Organismal injury and abnormalities
	Inflammatory disease
	Systemic toxicity top toxicological functions
	Liver cholestasis
	Liver inflammation
	Liver cirrhosis
	Liver steatosis

B	
	Carcinogenicity top canonical pathways
	Molecular mechanisms of cancer
	Carcinogenicity top diseases and disorders
	Cancer
	Dermatological diseases and conditions
	Gastrointestinal disease
	Hepatic system disease
	Carcinogenicity top biological functions
	Cell death and survival
	Cellular growth and proliferation
	Cellular movement
	Cell cycle
	Carcinogenicity top toxicological functions
	Necrosis/cell death
	Hepatocellular carcinoma
	Liver hyperplasia/hyperproliferation
	Liver inflammation/hepatitis

## 5. DISCUSSÃO

O presente projeto de doutorado e seus resultados foram sumarizados no artigo aceito pela revista Lab-on-a-chip, intitulado "Combinação de um sistema microfisiológico de três equivalentes de órgãos e transcriptômica para avaliar desfechos toxicológicos para ingredientes cosméticos". Neste artigo, detalha-se o estudo para desenvolvimento de uma nova abordagem metodológica utilizando a tecnologia de sistemas microfisiológicos, onde foram combinados equivalentes de pele, fígado e intestino, para avaliação de desfechos toxicológicos complexos, como toxicidade sistêmica e carcinogenicidade, por meio da análise de painéis gênicos por transcriptômica.

Atualmente, não há metodologias alternativas validadas para a avaliação destes desfechos. Para avaliação de toxicidade sistêmica, quando não há dados disponíveis na literatura, é necessário aplicar um racional de avaliação de risco por meio de cálculos que definem limites seguros de uso de ingredientes (TTC – *Threshold of Toxicological Concern*)<sup>40</sup>. Este racional nem sempre é aplicável, a depender da classe química da molécula em estudo e da concentração de intenção de uso, e, quando aplicável é, muitas vezes, bem restritivo e conservador, liberando concentrações baixas de uso, o que impacta diretamente na eficácia dos produtos. Para carcinogênicas que atuem por mecanismos genotóxicos <sup>43,44</sup>, mas para carcinogênicos não genotóxicos ainda não há metodologia validada disponível. A metodologia aqui desenvolvida se mostrou robusta para avaliação destes desfechos toxicológicos complexos.

De forma resumida, a metodologia desenvolvida nesta tese se inicia com a produção dos equivalentes de órgãos em laboratório. A biofabricação dos equivalentes deve ser planejada de forma que os três estejam prontos para utilização da mesma data. Neste dia, os equivalentes são integrados no dispositivo microfluídico de forma a mimetizar a direção fisiológica do fluxo. Para isso, a pele 3D é integrada no compartimento central, onde posteriormente é realizada a exposição tópica. No compartimento seguinte (compartimento menor do lado direito) são adicionados os equivalentes de fígado, visando a metabolização dos compostos antes de chegar ao próximo compartimento, onde é inserida a barreira intestinal. Os parâmetros na unidade controladora são ajustados para mimetizar o fluxo fisiológico. Em seguida, é

realizada a exposição tópica com a substância de interesse e, após o tempo de exposição, no caso 24 horas, são avaliadas a viabilidade de cada tecido e a modulação em sua expressão gênica.

Para a avaliação da expressão gênica, foram desenvolvidos painéis de assinatura gênica para cada um dos desfechos toxicológicos. Tais painéis são conjuntos de genes diferencialmente expressos em um modelo biológico após tratamento de interesse, que constituem uma assinatura gênica para predição de um desfecho toxicológico. Para isso, os marcadores biológicos de maior relevância foram buscados na literatura, em artigos científicos, bases de dados toxicológicos, relatórios de comitês científicos internacionais, entre outros. Cada painel é composto por 92 marcadores e 4 genes controles endógenos. A transcriptômica foi selecionada como técnica de análise visto que alterações na expressão gênica, após exposição a xenobióticos, podem representar eventos celulares precoces e mecanisticamente relevantes que contribuem para o início e a progressão de eventos adversos <sup>66</sup>.

Para montagem dos sistemas microfisiológico, a pele 3D é produzida por bioimpressão em insertos utilizando fibroblastos e queratinócitos primários juntamente à matriz na biotinta para impressão da derme e da epiderme, respectivamente. O cultivo da pele bioimpressa por 10 dias é suficiente para a sua maturação. Quanto aos equivalentes hepáticos, estes são produzidos no formato de esferoides a partir de linhagem de hepatócitos (HepG2/C3A) e de células estreladas primárias (HHSTeC), ambos tipos celulares necessários para a funcionalidade do fígado. Os esferoides são formados utilizando moldes de agarose e o tempo de cultivo necessário para a sua produção é de 4 dias. Já os equivalentes de barreira intestinal são produzidos manualmente em insertos, utilizando linhagens de células epiteliais intestinais (Caco-2) e células produtoras de muco (HT-29) e, após o plaqueamento, são mantidos em processo de diferenciação por 21 dias.

Os equivalentes de órgãos biofabricados foram caracterizados e mostraram robustez e fisiologia adequadas. Os ensaios de caracterização demonstraram que a pele reconstruída 3D foi bioimpressa de forma íntegra e coesa e possui as camadas principais da pele bem diferenciadas, como ilustrado nas imagens de histologia. Além disso, os dados de imunofluorescência indicaram que o equivalente estava diferenciado, devido à presença de ácido hialurônico sintetase (Has-2), citoqueratina 10 (CK-10) e involucrina, como apresentado na Figura 1. Este

equivalente de órgão já havia sido previamente caracterizado pela Natura Cosméticos por ser usado rotineiramente em testes pré-clínicos<sup>67</sup>.

O equivalente de barreira intestinal biofabricado seguindo protocolos previamente estabelecidos<sup>57</sup>também apresentou caracterização adequada, com forma, robustez, resistência, coesividade e expressão de marcadores intestinais de acordo com o esperado (Figura 2). Para estes equivalentes, o tempo de diferenciação até a prontidão para integração e realização dos testes nos sistemas microfisiológicos é de 21 dias e, por isso, a caracterização foi realizada ao longo deste período. As medidas de resistência transepitelial aumentaram com o tempo e estabilizaram após a diferenciação, indicando uma barreira robusta <sup>68–70</sup>. Os ensaios de viabilidade cellular (MTT e CellTiter) também indicaram um tecido viável até o 21º dia de diferenciação, data em que os equivalentes foram transferidos para os dispositivos microfluídicos para montagem do sistema microfisiológico. A expressão de marcadores intestinais clássicos, como transportadores, receptores e proteínas de adesão e produção de muco, foi observada indicando a funcionalidade da barreira intestinal. Houve aumento da expressão de SLC5A1, ATP1A1, ABCB1, MUC2 e CLDN2 durante a diferenciação.

O gene SLC5A1 expressa uma proteína integrante da família do transportador de glicose <sup>71</sup> dependente de sódio (SGLT). A proteína de membrana integral codificada é o mediador primário da captação de glicose e galactose na dieta do lúmen intestinal. O gene ATP1A1 A proteína codificada por este gene pertence à família das ATPases de transporte de cátions do tipo P e à subfamília das Na+/ K+ -ATPases. A Na+/K+ – ATPase é uma proteína de membrana integral que estabelece e mantém os gradientes eletroquímicos dos íons Na+ e K+ através da membrana plasmática. Tais gradientes são essenciais para a osmorregulação e para o transporte acoplado ao sódio de uma variedade de moléculas orgânicas e inorgânicas<sup>71</sup>. O gene ABCB1 codifica uma proteína associada à membrana, integrante da superfamília de transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC). As proteínas ABC são responsáveis pelo transporte de várias moléculas através das membranas extra e intracelulares e a proteína codificada pelo gene ABCB1, especificamente, é uma bomba de efluxo de drogas dependente de ATP para xenobióticos. Mutações no gene ABCB1 estão associadas à resistência à colchicina e doença inflamatória intestinal<sup>71</sup>. O gene TJP1 codifica um membro da família de proteínas guanilato quinase associada

à membrana (MAGUK) e a proteína atua como adaptadora de junção apertada que também regula as junções aderentes intestinais, que regulam o movimento de íons e macromoléculas entre as células endoteliais e epiteliais<sup>71</sup>. O gene MUC2 codifica uma mucina, isto é, uma glicoproteína de alto peso molecular produzida por tecidos epiteliais. Esta proteína é secretada e forma a barreira de muco responsável pela proteção do lúmen intestinal<sup>71</sup>. Por fim, o gene CLDN2 codifica uma claudina, proteína integrante da principal família de proteínas localizadas nas junções oclusivas (tight junctions) intestinais e tem alta expressão no intestino em condições fisiológicas<sup>71</sup>.

A expressão dos marcadores SLC5A1, ATP1A1 e ABCB1 aumenta ao decorrer dos dias da diferenciação, indicando que ao se diferenciar e atingir confluência, integridade e coesão de um equivalente de barreira intestinal bem formado, os biomarcadores de transportador de glicose, osmorregulação e bomba de efluxo de drogas são mais expressos. Marcadores de junções apertadas, transportadores de glicose, de Na+/K- ATPase e de ATP, típicos de barreira intestinal foram expressos, demonstrando características típicas do tecido.

Os dados de histologia e microscopia ótica apresentaram uma barreira coesiva e bem formada, com células justapostas e com produção de muco. A coesividade foi também avaliada por imunofluorescência com marcação de faloidina e ocludina durante a diferenciação e houve aumento de ambas, indicando melhora na robustez e adesão celular ao final do período de diferenciação. A análise deste equivalente por microscopia eletrônica revelou a presença de microvilosidades e aparência de muco na superfície celular, suportando as demais observações feitas sobre a diferenciação do equivalente de barreira intestinal.

Os equivalentes de fígado, na forma de esferoides hepáticos, também demonstraram caracterização adequada, com boa formação, funcionalidade e formato esférico robusto, sem centros necróticos (Figura 3). O tamanho dos esferoides variou entre 400 e 500 µm e estes se mostraram viáveis em até 21 dias de cultivo após a biofabricação.

Para avaliar a funcionalidade dos equivalentes, foram realizadas medidas de secretoma (glicose, triglicérides e colesterol) e os níveis metabólicos se mostraram estáveis. Além disso, foi realizada a checagem de marcadores de expressão gênica clássicos, entre eles CYP3A4, BSEP, ALB, PPARA, FTL e FTH1.

O gene CYP3A4 codifica uma proteína integrante da superfamília de enzimas do citocromo P450. As proteínas do citocromo P450 são monooxigenases que catalisam muitas reações envolvidas no metabolismo de drogas e na síntese de colesterol, esteróides e outros lipídeos. Esta enzima está envolvida no metabolismo aproximadamente metade dos medicamentos em uso hoje, incluindo de acetaminofeno, codeína, ciclosporina A, diazepam, eritromicina e cloroquina. A enzima também metaboliza alguns esteróides e substâncias carcinogênicas e está relacionada com metabolismo e detoxificação do fígado<sup>71</sup>. O gene BSEP (ou ABCB11) codifica uma proteína associada à membrana, integrante alfa da superfamília de transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC). As proteínas ABC transportam várias moléculas através das membranas extra e intracelulares. A proteína codificada por este gene é a principal bomba de exportação de sal biliar canalicular. As mutações neste gene estão associadas a colestases intra-hepáticas familiares progressivas, um grupo de doenças hepáticas hereditárias<sup>71</sup>. O gene ALB codifica a albumina, proteína mais abundante no sangue humano. Tal proteína atua na regulação da pressão osmótica do coloide do plasma sanguíneo e funciona como transportadora para uma ampla gama de moléculas endógenas, incluindo hormônios, ácidos graxos e metabólitos, além de drogas exógenas. Esta proteína é produzida essencialmente no fígado e, portanto, sua expressão está diretamente relacionada à funcionalidade deste órgão<sup>71</sup>. O gene PPARA codifica proteínas receptoras específicas, chamados PPARs, que pertencem a uma superfamília de receptores nucleares. Os PPARs afetam a expressão de genes-alvo envolvidos na proliferação e diferenciação celular e nas respostas imunológicas e inflamatórias e foram identificados três subtipos relacionados (alfa, beta e delta/gama). Este gene codifica o subtipo PPAR-alfa, que é um fator de transcrição nuclear intimamente relacionado ao metabolismo de lipídeos, principalmente relacionados à lipólise e β-oxidação de ácidos graxos, e ao metabolismo de colesterol. Além disso, também é grande responsável pela produção de citocinas inflamatórias. Esta isoforma é altamente expressa em fígado<sup>71</sup>. Os genes FTL e FTH1 estão associados à produção e transporte de ferritina e manutenção do estado não tóxico<sup>71</sup>.

Os dados de expressão gênica mostraram aumento de CYP3A4, BSEP, ALB, PPARA e FTL com o tempo, o que sugere a funcionalidade do equivalente, especificamente para a albumina, dada a correlação reportada entre os níveis de expressão de mRNA de albumina no fígado humano e a concentração de albumina no soro <sup>72,73</sup>, e para CYP3A4, dada a correlação reportada entre a proteína CYP3A4, sua atividade e seus níveis de mRNA <sup>74</sup>.

A análise histológica também confirmou a robustez dos equivalentes hepáticos, indicando esferoides bem formados, com bordas intactas e com a morfologia de hepatócitos e células estreladas esperada. Quanto aos dados de imunofluorescência, a marcação com DAPI e rodamina/faloidina indicou uma estrutura esférica coesiva e integral, sem centros necróticos, enquanto a presença de CYP3A4 sugeriu sua funcionalidade.

Em seguida, os equivalentes foram integrados nos dispositivos microfluídicos conforme a seguinte configuração: no compartimento da esquerda foi inserida a barreira intestinal, no compartimento central foi inserida a pele 3D e no compartimento da direita foram inseridos os esferóides hepáticos. O fluxo foi direcionado no sentido horário, seguindo da pele, onde é realizado a exposição tópica, para o fígado, onde pode haver metabolização, e só em seguida atingindo o intestino, seguindo a direção fisiológica. Os valores dos parâmetros vácuo, pressão e frequência foram selecionados na unidade controladora de forma a mimetizar o fluxo sanguíneo humano.

Em seguida, antes de realizar os testes toxicológicos com as substâncias de interesse, analisou-se o impacto do fluxo de meio de cultura no dispositivo microfluídico na viabilidade e funcionalidade dos equivalentes, visando utilizar modelos biológicos estáveis nas novas abordagens metodológicas propostas. Para isso, foram avaliadas a viabilidade celular e a expressão gênica de marcadores de cada equivalente nas condições estática e dinâmica (em fluxo) (Figura 5).

Para a pele 3D, um aumento na viabilidade foi observado após a integração no sistema microfisiológico, indicando uma melhora na condição fisiológica, no entanto não foi estatisticamente significativo. Os marcadores gênicos foram expressos nas duas condições e o fluxo afetou principalmente a expressão de LORI, que é normalmente expressa na epiderme e represente um mecanismo defensivo<sup>75</sup>. Este achado sugere que a condição dinâmica deve sinalizar para o equivalente de pele se proteger contra o fluxo, o que não impactou na viabilidade tecidual.
Para a barreira intestinal, a viabilidade não foi afetada pelo fluxo. Já os marcadores gênicos foram expressos em ambas as condições, mas houve modulação. SLC5A1 e TJP1 foram mais expressos na condição estática, indicando que o fluxo pode afetar o transporte de glicose e as junções de oclusão. No entanto, ATP1A1, MUC2 e CLDN2 foram significantemente mais expressos na condição dinâmica, sugerindo que o fluxo pode melhorar as condições fisiológicas deste cultivo 3D.

Para os equivalentes de fígado também não houve impacto na viabilidade celular na condição dinâmica. No entanto, marcadores gênicos sofreram modulação após aplicação do fluxo. CYP3A4 teve a expressão transcricional aumentada na condição dinâmica, o que pode indicar que o metabolismo de xenobióticos fica mais ativo no sistema microfisiológico. BSEP e ALB foram mais expressos na condição estática, sugerindo que o fluxo afeta a expressão de proteínas responsáveis pelo transporte de sais biliares e de albumina, uma das proteínas mais abundantes neste órgão. Os achados na condição dinâmica sugerem que o ambiente microfisiológico pode causar algumas perturbações celulares, como lixiviação, devido ao fluxo, mas tais perturbações não são capazes de afetar a viabilidade destas culturas.

Em seguida, após verificar a estabilidade dos equivalentes no sistema microfisiológico, foram realizados os tratamentos com as substâncias de interesse para validar o modelo proposto para avaliação dos desfechos toxicológicos de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade.

Para toxicidade sistêmica, a substância selecionada foi o acetaminofeno, popularmente conhecido como paracetamol ou APAP. Esta substância foi escolhida por ser um tóxico hepático conhecido e ter efeitos sistêmicos no intestino, sendo assim uma boa substância para demonstrar que o modelo é capaz de avaliar este desfecho toxicológico. Já para a avaliação de carcinogenicidade foi selecionado o formaldeído, um carcinogênico com classificação harmonizada. A permeação dérmica de ambas as substâncias foi predita utilizando análise in sílico e uma calculadora de permeação dérmica <sup>27,76</sup> e, após esta verificação, um estudo de escolha de dose foi realizado. Diferentes doses, com base na literatura, foram testadas tanto em células de derme e epiderme como em esferóides hepáticos, visando entender o seu impacto na viabilidade celular e na expressão de marcadores gênicos relevantes. Foi selecionada uma dose que impactasse a expressão gênica, modulando marcadores toxicológicos,

mas que não diminuísse a viabilidade celular a níveis inferiores de 60%, garantindo que os equivalentes avaliados estariam ainda viáveis. Foram selecionadas as doses de 3.75 mM para o acetaminofeno e 60 µM para o formaldeído.

Para a realização dos testes de avaliação de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade, os equivalentes foram integrados nos dispositivos microfluídicos conforme mencionado anteriormente e os tratamentos com acetaminofeno e formaldeído, respectivamente, foram realizados topicamente sobre a pele. Como controle negativo, foi utilizado o tratamento com meio de cultura em outros sistemas microfisiológicos montados da mesma forma. A exposição foi de 24 horas, o que caracteriza uma exposição aguda.

Após o tempo de exposição, foi realizado um ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (Figura 6). Para a exposição ao o acetaminofeno, viu-se que não houve efeito nos equivalentes de barreira intestinal, a pele 3D teve viabilidade de cerca de 80% e os esferóides hepáticos de 60%, indicando que a substância foi capaz de produzir toxicidade sistêmica, mas os equivalentes permaneceram viáveis. Para a exposição ao formaldeído, os equivalentes de fígado e intestino mostraram alta viabilidade pós-tratamento, mas a pele apresentou uma queda na viabilidade para 60%, indicando que a substância-teste apresentou alguma toxicidade para a pele.

O cenário inflamatório no fluído circulante entre as três câmaras do dispositivo microfluídico também foi avaliado por meio da medida de secreção de duas citocinas (IL-1 e IL-6) em ensaio de ELISA (Figura 6C). Os resultados indicaram o aumento na produção de ambas as citocinas após exposição ao formaldeído, sugerindo dano às culturas e corroborando com os resultados de viabilidade.

Por fim, para a verificação de eventos iniciais de toxicidade, os painéis gênicos de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade foram utilizados para a avaliação da modulação de expressão gênica por PCR em tempo real. O material biológico dos 3 equivalentes de órgãos foi avaliado separadamente para cada um dos painéis, para entender os efeitos das substâncias em cada um deles.

Após exposição ao acetaminofeno, houve modulação de vários genes presentes no painel de toxicidade sistêmica tanto nos equivalentes de fígado quanto de intestino, mas principalmente nos de fígado. Para este desfecho não foi avaliada a modulação da expressão gênica na pele 3D, visto que aqui o esperado era observar os efeitos sistêmicos após o tratamento tópico.

Nos esferóides hepáticos foram modulados genes associados com toxicidade hepática, inflamação, esteatose hepática, colestase hepática e metabolismo hepático. Foi observado aumento da expressão de AFP, ALB, APOE, FABP1, GPT, GSTA1 e SSP1, genes associados com toxicidade hepática após exposição ao paracetamol <sup>77–82</sup>. Além disso, genes relacionados à esteatose hepática (MLXIPL), à colestase hepática (NR1H4) e ao metabolismo no fígado (CYP3A4 e SULT2A1) também tiveram a expressão aumentada nestes equivalentes de órgãos <sup>80,83–86</sup>

Nos equivalentes de intestino, genes associados com toxicidade intestinal foram modulados após exposição tópica ao acetaminofeno. Genes como CFD e MIR215, associados à toxicidade intestinal, exibiram um leve aumento na expressão. A modulação também foi observada em genes relacionados às estruturas intestinais *brush borders* (ALPI e SI) e junções oclusivas (TJP1, TJP3 e CLDN1). A expressão de transportadores intestinais (SLC22A1) também foi modulada <sup>80,87–89</sup>.

Quanto à produção de citocinas inflamatórias pelos equivalentes de órgãos após exposição tópica à substância tóxica sistêmica, foi observada modulação de CCL5, Cd44, CXCL8, IL6, LCN e TNF-α<sup>89,90</sup>. Mais especificamente, houve aumento na expressão de CCL5, CD44 e TNF na pele <sup>91,92</sup>, CCL5 e LCN 2 no fígado <sup>83,84</sup> e CXCL8, IL6 e TNF na barreira intestinal <sup>88</sup>, indicando que o paracetamol é capaz de modular diferentes vias inflamatórias dependendo do tecido afetado e os efeitos observados corroboram com estudos reportados anteriormente. Estes achados sugerem que houve aumento no ambiente inflamatório, com ativação direta de cascatas de irritação após o tratamento tópico.

Além das análises de modulação de expressão de genes de forma individual, foi utilizado o software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)<sup>93</sup>, que analisa as vias biológicas moduladas, gerando insights sobre os mecanismos biológicos e possibilitando uma visão mecanística dos efeitos observados. O metabolism de acetaminofeno apareceu como uma das vias biológicas mais ativadas, como evidenciado pela superexpressão de genes como CYP3A4 e SULT2A1 <sup>80,83,85,86,94</sup>, induzindo hepatotoxicidade. Outras vias relevantes foram moduladas, como por

exemplo vias associadas com a biossíntese de bile, diretamente relacionadas à colestase hepática <sup>86,95–97</sup>. Houve também modulação de outras vias relacionadas ao metabolismo xenobiótico, como via de sinalização por PXR e por FXR. O software também lista as principais doenças, desordens e funções toxicológicas que podem ser induzidas por acetaminofeno quanto à modulação dos genes presentes no nosso painel e entre elas estavam doenças do sistema hepático e doenças gastrointestinais, corroborando com a efetividade do modelo proposto para avaliar o potencial de toxicidade sistêmica.

Já para a avaliação de carcinogenicidade, os efeitos tóxicos do formaldeído foram avaliados nos três equivalentes de órgãos após a exposição tópica no sistema microfisiológico. Na pele, este tratamento resultou em aumento de genes associados com proliferação celular, como CCNE1, CCND1, SAV1, JAK2, STAT5A, JAG1, MDM2 e ERBB2. JAG1, ERBB2 e MDM2 também atuam na sobrevivência celular, uma característica clássica de tumores em desenvolvimento <sup>42,98–102</sup>. Além disso, genes relacionados ao processo de angiogênese <sup>42,103</sup>, como VEGFA e VEGFB tiveram expressão aumentada no equivalente de pele após exposição ao formaldeído.

Esta substância provocou ainda efeitos inflamatórios, dado o aumento da expressão de CD44 e NFKB1 na pele 3D, IL6 na barreira intestinal e NFKB1 no fígado, também sugerindo aumento da resposta inflamatória por vias distintas em cada cultura 3D e indicando potencial irritação dérmica.

A análise com o software IPA também foi realizada para o painel de carcinogenicidade. Para a pele 3D, a via "Mecanismos moleculares do câncer" foi uma das mais moduladas e câncer foi a principal doença/desordem apontada. A ativação de vias envolvidas no desenvolvimento e progressão de câncer de pele também foram elencados pelo software como vias biológicas moduladas no equivalente de pele após exposição ao formaldeído. Estes achados sugerem o potencial carcinogênico desta substância no equivalente de pele no sistema microfisiológico.

O tratamento tópico ao formaldeído também influenciou a expressão gênica nos equivalentes hepáticos, modulando vias-chave do câncer como PI3K-AKT-mTOR, Ras-Raf-MAPK e Notch. Estas vias são vitais para a sinalização celular, metabolismo, angiogênese, sobrevivência, invasão e outros mecanismos do câncer <sup>42,100,101,104</sup>. A ativação de vias relacionadas à carcinoma hepatocelular foi observada nas análises.

No equivalente de barreira intestinal também houve modulação na expressão gênica após exposição ao formaldeído. Genes relacionados a vias biológicas do câncer foram modulados, como HIF1A, envolvido na hipóxia; IL6, envolvido em processos inflamatórios; KIT, envolvido na proliferação e sobrevivência celular; e TWIST1, envolvido no processo de metástase. A ativação de vias relacionadas ao câncer colorretal foi observada nas análises.

Estes dados sugerem que a exposição ao formaldeído impactou genes envolvidos em processos-chave do câncer nos três equivalentes de órgãos nos sistemas microfisiológicos e indicam que o modelo proposto é promissor para a avaliação do potencial carcinogênico de químicos em diferentes órgãos.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram produzidos e caracterizados equivalentes de órgãos pele 3D, barreira intestinal e esferoides hepáticos, com robustez, integridade, viabilidade e funcionalidade. Após a caracterização, os equivalentes de órgãos foram integrados no dispositivo microfluídico HUMIMIC Chip3, gerando um sistema microfisiológico capaz de replicar parte da fisiologia humana, incluindo conexões entre órgãos e sistema circulatório. Após tratamento tópico, os efeitos de substâncias foram avaliados nos equivalentes de órgãos por meio de painéis gênicos compostos por 92 marcadores biológicos relevantes.

Este sistema foi desenvolvido para avaliar desfechos toxicológicos complexos, como toxicidade sistêmica e carcinogenicidade, de ingredientes aplicados topicamente, mas outras questões importantes podem ser respondidas utilizando o mesmo modelo e aplicando outros painéis gênicos relevantes para a análise. O sistema apresenta versatilidade, visto que além da exposição tópica na pele 3D, é possível avaliar exposição oral por meio da aplicação no equivalente de barreira intestinal e ainda exposição sistêmica, aplicando o tratamento diretamente no meio de cultura no compartimento hepático. Sendo assim, este sistema microfisiológico permite, além de avaliação toxicológica, verificar qual a melhor via de administração de substâncias e os efeitos decorrentes de diferentes vias de exposição. Comparado a modelos de cultura in vitro estáticos, o modelo proposto neste estudo oferece ainda uma representação mais fisiológica da biologia humana, permitindo uma avaliação mais acurada de potenciais efeitos de ingredientes e produtos químicos.

Para avaliar a eficácia do modelo, foram testadas duas substâncias com potencial toxicológico conhecido para toxicidade sistêmica e carcinogenicidade. Os efeitos causados por tais químicos foram avaliados por meio da avaliação da modulação da expressão gênica em cada equivalente de órgão utilizando painéis de assinaturas gênicas desenvolvidos a partir dos principais marcadores moleculares expressos nestes órgãos e que atuam nos dados desfechos toxicológicos. A expressão gênica foi modulada de acordo com o esperado, demonstrando a efetividade do modelo para este tipo de avaliação.

Em resumo, o presente trabalho propõe uma nova abordagem metodológica que agregará no peso de evidências para avaliação de desfechos toxicológicos complexos. Os resultados indicam a capacidade do modelo de predizer

o potencial de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade de ingredientes químicos. A metodologia foi desenvolvida para este fim, mas devido à sua versatilidade pode ser aplicada para responder uma vasta gama de questões que se relacionem aos equivalentes de órgãos utilizados. O modelo pode ser aplicado não só na indústria cosmética, mas também alimentícia, farmacêutica e agroquímica, onde pode ter papel vital no desenvolvimento de novos ingredientes, particularmente na avaliação toxicológica de novas moléculas para as quais não há dados disponíveis na literatura.

Como perspectivas futuras, testes adicionais utilizando substâncias conhecidas que atuem por outros mecanismos de ação devem ser conduzidos para avaliar a abrangência da aplicação do modelo. Além disso, extrapolação das doses in vitro para in vivo, por meio de modelos farmacocinéticos baseados em fisiologia (PBPK), é necessária para determinar doses relevantes para humanos, a serem utilizadas como ponto de partida para a realização de cálculos no processo de avaliação de risco que garante a segurança dos consumidores.

## 7. REFERÊNCIAS

- 1 Tikveel W. Trials of War Criminals before the Nuremberg military tribunals under control council law. *US Government Printinc Office* 1949.
- 2 de Ávila RI, Valadares MC. Brazil Moves Toward the Replacement of Animal Experimentation. *Alternatives to Laboratory Animals* 2019. doi:10.1177/0261192919856806.
- 3 Hartung T. Opinion versus evidence for the need to move away from animal testing. *ALTEX* 2017. doi:10.14573/altex.1703291.
- 4 Stokes WS. Animals and the 3Rs in toxicology research and testing. *Hum Exp Toxicol* 2015. doi:10.1177/0960327115598410.
- 5 McCally, A. W.; Farmer, A.G; Loomis EC. CORNEAL ULCERATION FOLLOWING USE OF LASH-LURE. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 1933; **101**: 1560.
- 6 OECD. OECD considers Animal Welfare in the Development of Test Guidelines. 2009.http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/animal-welfare.htm.
- 7 NACIONAL C. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. 2008.
- 8 MCTI. CONCEA. https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea. .
- 9 Hartung T. Food for thought; Look back in anger What clinical studies tell us about preclinical work. *ALTEX* 2013. doi:10.14573/altex.2013.3.275.
- 10 Bailey J, Thew M, Balls M. An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* 2014.
- 11 Bart van der Worp H, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? PLoS Med 2010. doi:10.1371/journal.pmed.1000245.
- 12 ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. 2013.

- 13 Marin TM, Pagani E. Sistemas microfisiológicos compostos por organoides humanos em dispositivos microfluídicos: avanços e desafios. Vigilância Sanitária em Debate 2018. doi:10.22239/2317-269x.01053.
- 14 Russel WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. Methuen: London, 1959.
- 15 Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2015.
- 16 Marin TM, Pagani E. Sistemas microfisiológicos compostos por organoides humanos em dispositivos microfluídicos: avanços e desafios. *Visa em debate* 2018; 6. doi:http://dx.doi.org/10.22239/2317-269x.01053.
- 17 Leist M, Hasiwa N, Daneshian M, Hartung T. Validation and quality control of replacement alternatives - Current status and future challenges. Toxicol Res (Camb). 2012. doi:10.1039/c2tx20011b.
- 18 Wilhelmus KR. The Draize eye test. Surv Ophthalmol. 2001. doi:10.1016/S0039-6257(01)00211-9.
- 19 Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1944.
- 20 EU. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 530 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of 531 the laws of the Member States relating to cosmetic products. 2003.
- 21 Klein J. EU Cosmetics Directive and the Ban on Animal Testing: Compliance, Challenges, and the GATT as a Potential Barrier to Animal Welfare. *Transnational Law & Contemporary Problems* 2012; **21**: 252–275.
- 22 Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, Van Benthem J, Zuang V *et al.* Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: Current status and future prospects-2010. Arch Toxicol. 2011. doi:10.1007/s00204-011-0693-2.

- OECD. OECD TG 491 Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying
   i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring
   Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. In: OECD guidelines for
   the testing of chemicals. Organisation for Economic Cooperation and
   Development: Paris, 2018, p 14.
- OECD. OECD TG 431 In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. In: OECD guidelines for the testing of chemicals.
   Organisation for Economic Cooperation and Development: Paris, 2016, p 8.
- 25 OECD. OECD TG 432 In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. In: OECD guidelines for the testing of chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development: Paris, 2004, p 15.
- 26 OECD. OECD TG 492 Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. In: OECD guidelines for the testing of chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development: Paris, 2018, p 35.
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 12 th revision.
   2023.
- 28 Hemmerich J, Ecker GF. In silico toxicology: From structure–activity relationships towards deep learning and adverse outcome pathways. Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci. 2020; **10**. doi:10.1002/wcms.1475.
- 29 Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP). OECD, 2018 doi:10.1787/9789264304796-en.
- 30 European Comission. EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM). https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-referencelaboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam\_en. https://joint-researchcentre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurlecvam\_en.

- 31 NTP. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/iccvam. https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/iccvam.
- 32 van der Zalm AJ, Barroso J, Browne P, Casey W, Gordon J, Henry TR *et al.* A framework for establishing scientific confidence in new approach methodologies. Arch Toxicol. 2022; **96**. doi:10.1007/s00204-022-03365-4.
- 33 MCTIC. PORTARIA Nº 491, DE 3 DE JULHO DE 2012. 2012.
- 34 CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014.2014.
- 35 CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016.2016.
- 36 MCTI/CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 54, DE 10 DE JANEIRO DE 2022. https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-normativaconcea-n-54-de-10-de-janeiro-de-2022-374148642.
- 37 CBMAlt. I Congresso Brasileiro de Métodos Alternativos ao Uso de Animais. https://cbmalt.com.br/. 2023.https://cbmalt.com.br/ (accessed 10 Oct2023).
- 38 Nohynek GJ, Antignac E, Re T, Toutain H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. Toxicol Appl Pharmacol. 2010. doi:10.1016/j.taap.2009.12.001.
- 39 OECD. Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD, 2018 doi:10.1787/9789264070707-en.
- 40 Kroes R, Kleiner J, Renwick A. The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. *Toxicological Sciences* 2005; **86**. doi:10.1093/toxsci/kfi169.
- 41 OECD. Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies. OECD, 2018 doi:10.1787/9789264071223-en.
- 42 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. 2011;144. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 43 OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD, 2020 doi:10.1787/9789264071247-en.

- 44 OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD, 2023 doi:10.1787/9789264264861-en.
- 45 Sasaki K, Bohnenberger S, Hayashi K, Kunkelmann T, Muramatsu D, Phrakonkham P et al. Recommended protocol for the BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2012. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.014.
- Dent M, Amaral RT, Da Silva PA, Ansell J, Boisleve F, Hatao M *et al.* Principles underpinning the use of new methodologies in the risk assessment of cosmetic ingredients. *Computational Toxicology* 2018; 7. doi:10.1016/j.comtox.2018.06.001.
- 47 ANVISA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília, 2012https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-paraavaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf/view.
- Krewski D, Acosta D, Andersen M, Anderson H, Bailar JC, Boekelheide K *et al.*Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2010; **13**. doi:10.1080/10937404.2010.483176.
- 49 Dehne E-M, Hasenberg T, Marx U. The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma. *Future Sci OA* 2017. doi:10.4155/fsoa-2017-0002.
- 50 Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. Nat Biotechnol. 2014. doi:10.1038/nbt.2989.
- 51 Wagner I, Materne E-M, Brincker S, Süßbier U, Frädrich C, Busek M et al. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. *Lab Chip* 2013. doi:10.1039/c3lc50234a.
- 52 Tao TP, Maschmeyer I, LeCluyse EL, Rogers E, Brandmair K, Gerlach S et al. Development of a microphysiological skin-liver-thyroid Chip3 model and its application to evaluate the effects on thyroid hormones of topically applied cosmetic ingredients under consumer-relevant conditions. *Front Pharmacol* 2023; **14**. doi:10.3389/fphar.2023.1076254.

- 53 Kühnl J, Tao TP, Brandmair K, Gerlach S, Rings T, Müller-Vieira U *et al.* Characterization of application scenario-dependent pharmacokinetics and pharmacodynamic properties of permethrin and hyperforin in a dynamic skin and liver multi-organ-chip model. *Toxicology* 2021; **448**. doi:10.1016/j.tox.2020.152637.
- Rudmann DG. The Emergence of Microphysiological Systems (Organs-on-chips) as Paradigm-changing Tools for Toxicologic Pathology. Toxicol Pathol. 2019; 47. doi:10.1177/0192623318809065.
- 55 Brescia S, Alexander-White C, Li H, Cayley A. Risk assessment in the 21st century: where are we heading? *Toxicol Res (Camb)* 2023; **12**. doi:10.1093/toxres/tfac087.
- 56 Torras N, García-Díaz M, Fernández-Majada V, Martínez E. Mimicking epithelial tissues in three-dimensional cell culture models. Front Bioeng Biotechnol. 2018;
  6. doi:10.3389/fbioe.2018.00197.
- 57 Marin TM, de Carvalho Indolfo N, Rocco SA, Basei FL, de Carvalho M, de Almeida Gonçalves K *et al.* Acetaminophen absorption and metabolism in an intestine/liver microphysiological system. *Chem Biol Interact* 2019. doi:10.1016/j.cbi.2018.11.010.
- 58 Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, Hasenberg T, Ramme AP, Hübner J *et al.* A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip* 2015. doi:10.1039/C5LC00392J.
- 59 Benam KH, Villenave R, Lucchesi C, Varone A, Hubeau C, Lee HH *et al.* Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nat Methods* 2016. doi:10.1038/nmeth.3697.
- 60 Marsano A, Conficconi C, Lemme M, Occhetta P, Gaudiello E, Votta E *et al.* Beating heart on a chip: A novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues. *Lab Chip* 2016. doi:10.1039/c5lc01356a.
- 61 Schimek K, Busek M, Brincker S, Groth B, Hoffmann S, Lauster R *et al.* Integrating biological vasculature into a multi-organ-chip microsystem. *Lab Chip* 2013. doi:10.1039/c3lc50217a.

- 62 Zhang B, Radisic M. Organ-on-a-chip devices advance to market. *Lab Chip* 2017;
  17. doi:10.1039/C6LC01554A.
- 63 Oleaga C, Bernabini C, Smith AST, Srinivasan B, Jackson M, McLamb W *et al.* Multi-Organ toxicity demonstration in a functional human in vitro system composed of four organs. *Sci Rep* 2016. doi:10.1038/srep20030.
- Esch EW, Bahinski A, Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery.Nat Rev Drug Discov. 2015. doi:10.1038/nrd4539.
- 65 Nam KH, Smith AST, Lone S, Kwon S, Kim DH. Biomimetic 3D Tissue Models for Advanced High-Throughput Drug Screening. J Lab Autom. 2015. doi:10.1177/2211068214557813.
- Joseph P. Transcriptomics in toxicology. Food and Chemical Toxicology 2017;
   109. doi:10.1016/j.fct.2017.07.031.
- 67 Millás A, Lago J, Vasquez-Pinto L, Massaguer P, Maria-Engler SS. Approaches to the development of 3d bioprinted skin models: the case of natura cosmetics. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB* 2019; 2. doi:10.25061/2595-3931/ijamb/2019.v2i1.24.
- 68 Gupta V, Doshi N, Mitragotri S. Permeation of Insulin, Calcitonin and Exenatide across Caco-2 Monolayers: Measurement Using a Rapid, 3-Day System. *PLoS One* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0057136.
- 69 Le Ferrec E, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P *et al.* In Vitro Models of the Intestinal Barrier . *Alternatives to Laboratory Animals* 2001; 29. doi:10.1177/026119290102900604.
- Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. J Lab Autom. 2015;
   20. doi:10.1177/2211068214561025.
- 71 Weizmann Institute of Science; LifeMap Sciences. GeneCards: The Human Gene Database. https://www.genecards.org/.
- 72 Ozaki I, Motomura M, Setoguchi Y, Fujio N, Yamamoto K, Kariya T *et al.* Albumin mRNA expression in human liver diseases and its correlation to serum albumin concentration. *Gastroenterol Jpn* 1991; **26**. doi:10.1007/BF02782816.

- Chojkier M. Inhibition of albumin synthesis in chronic diseases: Molecular mechanisms. J Clin Gastroenterol. 2005; 39. doi:10.1097/01.mcg.0000155514.17715.39.
- 74 Watanabe M, Kumai T, Matsumoto N, Tanaka M, Suzuki S, Satoh T *et al.* Expression of CYP3A4 mRNA Is Correlated with CYP3A4 Protein Level and Metabolic Activity in Human Liver. *J Pharmacol Sci* 2004; **94**. doi:10.1254/jphs.94.459.
- 75 Nithya S, Radhika T, Jeddy N. Loricrin An overview. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. 2015; **19**. doi:10.4103/0973-029X.157204.
- 76 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Finite Dose Skin
   Permeation Calculator.
   https://www.cdc.gov/niosh/topics/skin/finiteskinpermcalc.html.
- Schuppe-Koistinen I. Safety biomarkers: Opportunities and challenges in drug discovery and development. *Toxicol Lett* 2012; 211. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.046.
- 78 SAFE-T consortium. The Drug induced liver injury work package of Innovative Medicines Initiative SAFE-T Consortium and The Hepatotoxicity Working Group of Critical Path Institutes PSTC. 2016https://c-path.org/wpcontent/uploads/2018/01/summarydatapackage-safe-t-pstc-dili-los.pdf.
- 79 Amacher DE. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. Hum Exp Toxicol 2002; 21. doi:10.1191/0960327102ht247oa.
- 80 Gupta RC. *Biomarkers in Toxicology*. 2014 doi:10.1016/C2012-0-01373-7.
- 81 Schnackenberg L, Yang X, Salminen. Current and emerging biomarkers of hepatotoxicity. *Curr Biomark Find* 2012. doi:10.2147/cbf.s27901.
- 82 Campion S, Aubrecht J, Boekelheide K, Brewster DW, Vaidya VS, Anderson L *et al.* The current status of biomarkers for predicting toxicity. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013; **9**. doi:10.1517/17425255.2013.827170.
- 83 Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S *et al.* Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in

investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. Arch Toxicol. 2013; **87**. doi:10.1007/s00204-013-1078-5.

- 84 Ellinger-Ziegelbauer H, Adler M, Amberg A, Brandenburg A, Callanan JJ, Connor S et al. The enhanced value of combining conventional and 'omics' analyses in early assessment of drug-induced hepatobiliary injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252. doi:10.1016/j.taap.2010.09.022.
- 85 Orbach SM, Less RR, Kothari A, Rajagopalan P. In Vitro Intestinal and Liver Models for Toxicity Testing. ACS Biomater Sci Eng. 2017; 3. doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00699.
- 86 Blomme EAG, Yang Y, Waring JF. Use of toxicogenomics to understand mechanisms of drug-induced hepatotoxicity during drug discovery and development. Toxicol Lett. 2009; **186**. doi:10.1016/j.toxlet.2008.09.017.
- 87 Chen Y, Lin Y, Davis KM, Wang Q, Rnjak-Kovacina J, Li C *et al.* Robust bioengineered 3D functional human intestinal epithelium. *Sci Rep* 2015; **5**. doi:10.1038/srep13708.
- 88 Madden LR, Nguyen T V., Garcia-Mojica S, Shah V, Le A V., Peier A *et al.* Bioprinted 3D Primary Human Intestinal Tissues Model Aspects of Native Physiology and ADME/Tox Functions. *iScience* 2018; 2. doi:10.1016/j.isci.2018.03.015.
- 89 Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD *et al.* Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017; **312**. doi:10.1152/ajpgi.00048.2015.
- 90 Ajuebor MN, Swain MG. Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract. Immunology. 2002; 105. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01309.x.
- 91 Yasaka N, Furue M, Tamaki K. CD44 expression in normal human skin and skin tumors. *Journal of Dermatology* 1995; **22**. doi:10.1111/j.1346-8138.1995.tb03349.x.
- Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF-α production in the skin. Arch Dermatol Res. 2009; **301**. doi:10.1007/s00403-008-0893-7.

- 93 QIAGEN. QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis. 2022.https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insightsportfolio/analysis-and-visualization/qiagenipa/?cmpid=QDI\_GA\_IPA&gclid=Cj0KCQjwnvOaBhDTARIsAJf8eVPw4tFGHTP xNS0xeiNc01rdovWqeiaxmo5XavAHuV1r7IkE\_E08sZMaAgncEALw\_wcB.
- 94 Knöspel F, Jacobs F, Freyer N, Damm G, Bondt A De, Wyngaert I Van Den *et al.* In vitro model for hepatotoxicity studies based on primary human hepatocyte cultivation in a perfused 3D bioreactor system. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17040584.
- Evangelakos I, Heeren J, Verkade E, Kuipers F. Role of bile acids in inflammatory liver diseases. Semin Immunopathol. 2021; 43. doi:10.1007/s00281-021-00869-6.
- 96 Stofan M, Guo GL. Bile Acids and FXR: Novel Targets for Liver Diseases. Front Med (Lausanne). 2020; 7. doi:10.3389/fmed.2020.00544.
- 97 Gijbels E, Vinken M. An Update on Adverse Outcome Pathways Leading to Liver Injury. *Appl In Vitro Toxicol* 2017; **3**. doi:10.1089/aivt.2017.0027.
- 98 Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. Nat Rev Drug Discov. 2015; 14. doi:10.1038/nrd4504.
- 99 Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. Cell 2018; 173. doi:10.1016/j.cell.2018.03.035.
- 100 Yuan X, Wu H, Xu H, Xiong H, Chu Q, Yu S *et al.* Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. Cancer Lett. 2015; **369**. doi:10.1016/j.canlet.2015.07.048.
- 101 Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene. 2007; **26**. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
- 102 Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression.Physiology. 2010; 25. doi:10.1152/physiol.00045.2009.

- 103 Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. Journal of Clinical Oncology. 2005; 23. doi:10.1200/JCO.2005.06.081.
- 104 Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. Cell. 2017;169. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.
- 105 Thermo Fisher Scientific. TaqMan Array Plates for Gene Expression Analysis. https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/realtime-pcr-assays/taqman-gene-expression/96-well-taqman-gene-expressionassays.html.
- 106 Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2010; **141**. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- 107 Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I *et al.* Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. Environ Health Perspect. 2016; **124**. doi:10.1289/ehp.1509912.
- 108 Maschmeyer I, Hasenberg T, Jaenicke A, Lindner M, Lorenz AK, Zech J et al. Chip-based human liver-intestine and liver-skin co-cultures - A first step toward systemic repeated dose substance testing in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.002.
- 109 Aitio A, Anderson D, Blain P, Bond J, Buratti M, Calder I *et al.* Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles. Environmental Health Criteria. 1993.
- 110 Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD *et al.* Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017; **312**. doi:10.1152/ajpgi.00048.2015.
- 111 Jung EM, An BS, Yang H, Choi KC, Jeung EB. Biomarker genes for detecting estrogenic activity of endocrine disruptors via estrogen receptors. Int J Environ Res Public Health. 2012; 9. doi:10.3390/ijerph9030698.
- 112 Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM *et al.* Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. Endocr Rev. 2009; **30**. doi:10.1210/er.2009-0002.

- 113 Demeneix B, Slama R, Research Center. Endocrine Disruptors: from Scientific Evidence to Human Health Protection. *Study Requested by the PETI committee, European Parliament* 2019.
- 114 De Coster S, Van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. J Environ Public Health. 2012; 2012. doi:10.1155/2012/713696.
- 115 Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ Toxicol Pharmacol. 2015; 40. doi:10.1016/j.etap.2015.06.009.
- 116 La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. Nat Rev Endocrinol 2020; 16. doi:10.1038/s41574-019-0273-8.
- 117 Zuang V, Dura A, Asturiol Bofill D, Batista Leite S, Berggren E, Bopp S *et al. Nonanimal Methods in Science and Regulation.* 2020.
- 118 ECHA. The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation.2020.
- 119 European Comission. Second Annual Forum on Endocrine Disruptors. Luxembourg, 2021 doi:10.2779/32496.
- 120 Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 11TH REVISION. 2021 doi:10.2875/273162.
- 121 NIH. Gene National Center for Biotechnology Information (NCBI). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/.
- 122 Yale University School of Medicine. Comparative Toxicogenomics Database. http://www.ctdbase.org/.
- 123 Mattingly CJ, Rosenstein MC, Colby GT, Forrest JN, Boyer JL. The Comparative Toxicogenomics Database (CTD): A resource for comparative toxicological studies. In: *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 2006 doi:10.1002/jez.a.307.

- 124 Knut & Alice Wallenberg Foundation. THE HUMAN PROTEIN ATLAS. https://www.proteinatlas.org/.
- 125 Karlsson M, Zhang C, Méar L, Zhong W, Digre A, Katona B *et al.* A single–cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv* 2021; **7**. doi:10.1126/sciadv.abh2169.
- 126 3DBS. 3D BIOTECHNOLOGY SOLUTIONS. .
- 127 Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in Vitro* 2012. doi:10.1016/j.tiv.2012.03.009.
- 128 Chen XM, Elisia I, Kitts DD. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. J Pharmacol Toxicol Methods 2010. doi:10.1016/j.vascn.2010.02.004.
- 129 LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. Crit Rev Toxicol. 2012. doi:10.3109/10408444.2012.682115.
- 130 CELLINK. CELLINK. https://cellink.com/global/.
- 131 Millipore M. User Guide Millicell® ERS-2 Electrical Resistance System. 2016; :
   6–10.
- 132 Promega. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay. https://www.promega.com.br/products/cell-health-assays/cell-viability-andcytotoxicity-assays/celltiter-glo-3d-cell-viabilityassay/?gclid=Cj0KCQjwnvOaBhDTARIsAJf8eVPORPx3DC6FGu9QC6FM4cug dBxmNAhISDKjaTiOG\_6D2yhpG1muVugaAkLJEALw\_wcB&catNum=G9681.
- 133 Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. J Lab Autom. 2015;
   20. doi:10.1177/2211068214561025.
- 134 Schmidt FF, Nowakowski S, Kluger PJ. Improvement of a Three-Layered in vitro Skin Model for Topical Application of Irritating Substances. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8. doi:10.3389/fbioe.2020.00388.

- 135 Sarmento B, Andrade F, Da Silva SB, Rodrigues F, Das Neves J, Ferreira D. Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2012; 8. doi:10.1517/17425255.2012.673586.
- 136 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* 2001; 25. doi:10.1006/meth.2001.1262.

## 8. APÊNDICE

# Metodologia detalhada: Elaboração dos painéis de assinatura gênica para avaliação de desfechos toxicológicos

A tecnologia de PCR em tempo real foi empregada como metodologia de análise da modulação da expressão de genes relacionados aos desfechos toxicológicos de interesse e para isso foi necessária a elaboração destes painéis relacionados a cada desfecho avaliado. Os painéis gênicos são conjuntos de genes diferencialmente expressos no modelo biológico em estudo após um tratamento de interesse. Estes painéis constituem uma assinatura gênica para predição de um desfecho toxicológico, visto que alterações na expressão gênica, após exposição a xenobióticos, podem representar eventos celulares precoces e mecanisticamente relevantes que contribuem para o início e a progressão de eventos adversos <sup>66</sup>.

Tais painéis customizados foram adquiridos da empresa Thermo Fisher Scientific <sup>105</sup>, após a elaboração de cada um. Para isso, foi necessário o levantamento, cruzamento e interpretação de dados de literatura científica e bancos de dados para a busca de vias gênicas relacionadas desfechos toxicológicos de toxicidade sistêmica e carcinogenicidade. Os painéis customizáveis são compostos por 96 genes, sendo 4 deles genes endógenos de referência. São eles: GAPDH, GUSB, HRPT e 18s rRNA<sup>105</sup>.

Foram levantados 92 genes marcadores toxicológicos para avaliar cada desfecho, todos embasados na análise de estudos científicos e refinados em bancos de dados especializados. Foi necessário estudar a fundo cada um dos desfechos para explorar a maioria dos processos biológicos envolvidos em cada um deles, visando a montagem de um painel gênico amplo capaz de abranger diferentes mecanismos de ação de substâncias que podem levar aos eventos adversos relacionados a cada desfecho toxicológico.

O levantamento dos marcadores biológicos relevantes se iniciou pela curagem de dados provenientes de artigos científicos de alto impacto relacionados a cada um dos desfechos toxicológicos avaliados<sup>42,51,63,77-92</sup>. Além disso, foram consultados documentos de agências regulatórias e comitês científicos internacionais

relacionados à segurança de produtos visando aprofundar a busca pelos melhores marcadores toxicológicos. Dentre estes documentos estão relatórios do Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM)<sup>30</sup>, da Agência de Químicos Européia (ECHA)<sup>118</sup>, do Comitê Científico de Segurança do Consumidor (SCCS)<sup>120</sup>, entre outros.

Para cada desfecho toxicológico foram levantados muitos potenciais marcadores gênicos. Sendo assim, foi necessário um refinamento para definir os marcadores mais relevantes. Para isso, foram utilizados bancos de dados como o Gene<sup>121</sup> e o GeneCards<sup>71</sup>, que trazem informações sobre sequência, funções, processos biológicos e doenças relacionadas, além de dados de órgãos onde cada gene é expresso. O banco de dados Comparative Toxicogenomics Database<sup>122,123</sup> também foi utilizado como ferramenta para refinamento na construção de cada painel gênico. Este banco de dados traz informações sobre como a exposição a compostos químicos afeta a saúde humana por meio da interação com genes e proteínas. Nele é possível buscar respostas criando diferentes combinações de informações e atualmente o banco conta com mais de 50.000.000 de relações toxicogenômicas disponíveis para consulta. Para o presente projeto, foram buscadas informações sobre potenciais marcadores gênicos após correlação de substâncias sabidamente relacionadas aos desfechos toxicológicos e processos biológicos também relacionados, como por exemplo 3-methylcholanthrene e formaldeído e neoplasmas de pele fígado e intestino e acetaminofeno e hepatotoxicidade.

Outro filtro importante foi realizado utilizando o banco de dados The Human Protein Atlas<sup>124,125</sup>, onde é possível verificar dados de expressão gênica por tipo celular, o que auxiliou na definição de marcadores que são expressos nas linhagens celulares/células primárias utilizadas na confecção dos equivalentes de órgãos utilizados no projeto.

Para o painel gênico de carcinogenicidade foi realizado ainda um experimento de RNASeq em pele 3D tratada com 3-metilcolantreno<sup>45</sup>, uma substância sabidamente carcinogênica, visando filtrar genes que aparecessem nos resultados também, uma vez que o número de marcadores de carcinogenicidade é extenso e também são proteínas envolvidas em processos fisiológicos do organismo, o que aumenta o desafio de escolha dos marcadores mais relevantes para este desfecho toxicológico.

## 1. Células utilizadas

Para a confecção da pele humana 3D bioimpressa foram utilizadas linhagens primárias de fibroblastos e queratinócitos, células primordiais da derme e epiderme, respectivamente<sup>126</sup>.

Para o desenvolvimento do equivalente de barreira intestinal foi empregada uma co-cultura das linhagens celulares intestinais Caco-2 (ATCC HTB-37) e HT-29 (ATCC HTB-38). Ambas são linhagens epiteliais de adenocarcinoma colorretal que possuem a maioria das características morfológicas e funcionais de células absortivas do intestino delgado, incluindo enzimas digestivas e receptores. As células da linhagem HT-29 também possuem a capacidade de secretar mucina e outros compostos que formam o muco intestinal que auxilia a capacidade absortiva <sup>127,128</sup>.

Os esferoides hepáticos foram construídos com células HepG2/C3A (ATCC CRL-10741) co-cultivadas com células estreladas hepáticas humanas HHSteC (Human Hepatic Stellate Cells #5300, Sciencell). A linhagem HepG2/C3A é derivada de fígado com carcinoma hepatocelular. Trata-se de um clone da conhecida linhagem HepG2, porém com características menos aderentes. Estas células secretam proteínas plasmáticas hepáticas, como albumina, alfa-fetoproteína, transferrina, fibrinogênio, entre outras, além de efetuarem a biotransformação de muitos compostos xenobióticos e promoverem a bioativação de carcinógenos. As células estreladas hepáticas, também conhecidas como células perissinusoidais ou células de Ito, são depósitos de vitamina A e controlam a produção de matriz extracelular, além de estarem envolvidas na contratilidade do sinusóide hepático. Quando maduras, produzem colágeno, elastina, proteoglicanos de sulfato de heparano e de sulfato de condroitina, além de citocinas e fatores de crescimento para comunicação intercelular no fígado saudável e danoso <sup>129</sup>.

#### 2. Construção do modelo de pele equivalente 3D

A pele equivalente foi produzida utilizando a tecnologia de bioimpressão 3D. A etapa de bioimpressão foi realizada no laboratório *in vitro* da indústria Natura Cosméticos S/A. Nesta tecnologia, as biotintas de colágeno são carregadas com as células de interesse para formar a camada da derme a partir de fibroblastos primários, e da epiderme, em superfície ar-líquido, a partir de queratinócitos primários. A impressão e o cultivo da pele 3D foram realizados em insertos de cultivo celular de 0.6 cm<sup>2</sup> de área, contendo membrana porosa de policarbonato (Millipore, PIHP01250). Após a impressão, em cerca de 10 dias de cultivo a pele 3D atinge a maturação completa. O equipamento utilizado é uma bioimpressora da empresa sueca CELLINK<sup>130</sup>, modelo Inkredible, que utiliza o mecanismo de microextrusão no momento de sua impressão. Suas configurações de impressão são a partir de arquivos g code. Por motivos de proteção de propriedade intelectual, a metodologia da confecção deste cultivo 3D não será detalhada. Após sua construção, os equivalentes de pele 3D bioimpressos foram avaliados por técnica de viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT e por histologia.

## 3. Construção de modelo de equivalente de barreira intestinal

A construção do modelo de equivalente de barreira intestinal foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), utilizando as células Caco-2 e HT-29 cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina, em incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As linhagens foram mantidas separadamente em cultura por duas passagens, para possibilitar estabilização do fenótipo, antes de serem tripsinizadas, contadas e semeadas nos insertos de cultivo celular (*transwell*) com membrana porosa de policarbonato, com poros de 0.4 µm e área de filtração de 0.6 cm<sup>2</sup> (Millipore, PIHP01250). A co-cultura foi semeada e, posteriormente caracterizada. Por motivos de proteção de propriedade intelectual, não iremos detalhar a metodologia da confecção deste cultivo 3D.



**Figura 1. A.** Placa com as barreiras intestinais em diferenciação. **B.** Detalhe de um inserto contendo a barreira intestinal.

Durante os dias de cultivo, a resistência elétrica trans-epitelial (TEER) foi medida a cada 3 dias aproximadamente usando um voltímetro (Millicel ERS-2 meter). O aumento da TEER com o passar do tempo indica a confluência e integridade da barreira celular, além da ausência de buracos na membrana <sup>131</sup>. O modelo de barreira intestinal (B.I.) foi caracterizado utilizando técnicas para medida de viabilidade celular, expressão gênica e morfologia dos equivalentes a fim de entender a sua funcionalidade.

## 4. Construção do modelo de equivalente de fígado humano

A biofabricação dos equivalentes hepáticos foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). As células HepG2/C3A foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e1% de antibióticos penicilina e estreptomicina, em incubadora a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. As células HHSteC foram cultivadas em meio SteCM (Stellate Cell Medium, Sciencell), suplementado com 2% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina e 1% de suplemento para crescimento de células estreladas (Sciencell), em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

Para a formação de esferoides hepáticos, foi estabelecida uma co-cultura destas células. A co-cultura foi semeada e, posteriormente caracterizada. Por motivos de proteção de propriedade intelectual, não iremos detalhar a metodologia da confecção deste cultivo 3D.



Figura 2. A. Células hepáticas sedimentadas já no formato de esferoide. B. Esferoide de fígado formado em placa ultra low attachment.

O modelo de equivalente hepático foi caracterizado utilizando técnicas para medida de viabilidade celular, expressão gênica e morfologia dos equivalentes a fim de entender a sua funcionalidade.

# 5. Caracterização das culturas 3D

A caracterização das culturas 3D foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

## 5.1. Viabilidade celular por redução de MTT

A viabilidade dos equivalentes de órgãos foi analisada utilizando o ensaio de MTT. Este método avalia a viabilidade celular das culturas celulares e pode ser realizado após a exposição a uma substância de interesse, o que avalia a sua citotoxicidade.

O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5difeniltetrazólio) é baseado na redução do MTT, um sal amarelo solúvel em meio de cultura, que ocorre na mitocôndria das células viáveis, devido ao efeito da atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH. Esta redução leva à formação de cristais insolúveis de formazan de coloração roxa.

Após a realização de tratamento de interesse, as culturas 3D são incubadas com uma solução de MTT (1 mg/mL) por 3 horas em condições padrão de cultivo celular. Após esse intervalo, suficiente para a redução do MTT em formazan, o formazan é extraído por meio de solubilização em isopropanol e sua concentração determinada por densidade óptica.

A coloração roxa indica a viabilidade das células e a medida é realizada por meio da absorbância, tratando-se de um ensaio colorimétrico. Ao fim da reação, a absorção foi lida em leitor de placa no comprimento de onda de 570 nm e os valores de densidade óptica utilizados para calcular a viabilidade em porcentagem.

## 5.2. Viabilidade por quantificação de ATP

O reagente CellTiter foi empregado para mensurar a viabilidade dos esferoides hepáticos e dos equivalentes de barreira intestinal, após diferenciados e formados. Essa medida é realizada através da quantificação da produção de ATP (adenosina tri-fosfato) utilizando o ensaio enzimático CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (PromegaTM)<sup>132</sup>, desenvolvido para determinar a viabilidade celular em culturas 3D. O reagente do ensaio penetra nos esferoides hepáticos assim como nas camadas da barreira intestinal e tem capacidade lítica aumentada, permitindo a determinação de viabilidade de forma mais precisa em comparação com outros métodos de ensaio.

O teste se baseia na quantificação do ATP como um indicador de viabilidade e gera uma leitura de luminescência que é muito mais sensível que métodos colorimétricos ou baseados em fluorescência. O ensaio foi realizado em

triplicata de acordo com as instruções contidas no protocolo do fabricante e a leitura da luminescência foi realizada no leitor de placas GloMax (PromegaTM).

## 5.3. Histologia

Os equivalentes de pele 3D bioimpressos foram fixados em PFA 4% por 4 horas, em seguida passaram por uma bateria de lavagens e fixação em álcoois, xilol e, por último, inclusão em parafina. Já os esferoides hepáticos foram fixados overnight em PFA 4% em câmara fria, passaram por uma bateria de lavagens e fixações em álcoois, xilol e foram incluídos em parafina. Os equivalentes de barreira intestinal foram fixados em formalina 10% por 2 horas, seguido de uma bateria de lavagens e fixações em álcoois, xilol e, inclusão em parafina.

Os blocos de parafina foram cortados utilizando micrótomo, em secções de 5 µm. Em seguida passaram por coloração com Hematoxilina e eosina para checar as estruturas. Os equivalentes de barreira intestinal, além da coloração com hematoxilina e eosina, passaram por coloração com Alciam blue e Safranina, para checar a presença de muco. As fotos foram obtidas no microscópio DM6 (Leica).

## 5.4. Imunofluorescência

Para a obtenção de imagens por microscopia confocal, os esferoides hepáticos foram marcados com sondas fluorescentes específicas para núcleo, citoplasma e retículo endoplasmático, onde são produzidas as proteínas responsáveis pelo metabolismo e detoxificação de compostos tóxicos. Para marcação do retículo endoplasmático, o anticorpo primário CYP3A4 monoclonal anti-mouse foi utilizado na diluição de 1:250 em PBS com 1% BSA, overnight, em câmara fria. Em seguida, foi incubado com anticorpo secundário Alexa Fluor 488, na diluição 1:500 em PBS com 1% BSA. Para marcação do citoplasma foi utilizado Rodamina / Faloidina, na diluição 1:200, por 1 hora. Para marcação do núcleo foi utilizada a sonda fluorescente DAPI, diluída 1:10000 e incubada por 5 minutos.

Os equivalentes de barreira intestinal foram marcados com sondas fluorescentes específicas para marcar núcleo, citoplasma e junções apertadas. Para marcação das junções apertadas, o anticorpo primário Ocludina anti-mouse foi utilizado na diluição de 1:200 em PBS com 1% BSA, overnight, em câmara fria. Em seguida, foi incubado com anticorpo secundário Alexa Fluor 488, na diluição 1:500 em PBS com 1% BSA. Para marcação do citoplasma foi utilizado Rodamina/ Faloidina,

na diluição 1:200, por 1 hora. Para marcação do núcleo foi utilizada a sonda fluorescente DAPI, diluída 1:10000 e incubada por 5 minutos.

Após a incubação com as sondas os cortes foram lavados com PBS por 5 minutos e as lâminas foram montadas com meio de montagem. As imagens foram obtidas no microscópio confocal Leica© TCS SP8. Os comprimentos de onda para excitação e de emissão utilizados na captura das imagens estão contidos na tabela 1.

**Tabela 1.** Espectros de absorção e emissão das sondas utilizadas na microscopia confocal

Sonda	Excitação	Emissão
DAPI	359 nm	<b>457</b> nm
Rodamina Faloidina	540 nm	565 nm
CYP3A4/Alexa fluor	<b>488</b> nm	<b>520</b> nm
Ocludina/Alexa fluor	<b>498</b> nm	<b>517</b> nm

## 5.5. Atividade metabólica

A atividade metabólica dos equivalentes de fígado foi avaliada pelo secretoma monitorando níveis de glicose, triglicérides e colesterol no meio de cultura. O kit Glucose GOD-PAP (LaborLab) foi utilizado para mensurar os níveis de glicose, o kit Triglycerides GOD-PAP (LaborLab) foi utilizado para mensurar os níveis de triglicérides e o kit Cholesterol GOD-PAP utilizado para dosar colesterol. Os valores de *background* do meio de cultura foram descontados de cada leitura e plotados como a quantidade de cada composto produzido.

## 5.6. Resistência elétrica transepitelial (TEER)

O ensaio de medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) é uma técnica quantitativa amplamente utilizada para a mensuração da integridade das junções apertadas entre as células de monocamadas endoteliais e epiteliais. A integridade destas junções é um forte indicativo de confluência e integridade das barreiras celulares, característica importante para ensaios de permeação e transporte de compostos <sup>133</sup>. Esta avaliação foi realizada para os equivalentes de barreira intestinal.

A resistência elétrica transepitelial foi medida a cada três dias durante o processo de 21 dias de diferenciação das células intestinais, utilizando um multímetro

na função de medida de resistência. Após a calibração do equipamento e esterilização do eletrodo, conforme instruções do fabricante, o eletrodo foi imerso na cultura, colocando a ponta menor na parte de dentro do inserto e a ponta maior do lado de fora, dentro do poço da placa de 24 poços <sup>131</sup>.

Para a calibração da medida, primeiramente a resistência foi medida em um inserto de cultivo celular sem células, mas com a mesma quantidade de meio de cultura e alocado em um poço na mesma placa. Em seguida, a medida da resistência em todos os insertos, três medidas em regiões diferentes por inserto, foi realizada <sup>131</sup>.

O cálculo da resistência da barreira foi feito pela subtração da resistência do branco da média de resistência obtida na leitura de cada equivalente tecidual, seguida pela multiplicação pela área efetiva da membrana do inserto (0.6 cm<sup>2</sup>). O aumento da TEER, com o passar do tempo, é um indicativo da saúde, confluência e ausência de buracos da monocamada. A unidade de medida é  $\Omega$ .cm<sup>2 131</sup>.

## 5.7. Ensaios de permeabilidade aparente

Ensaios de permeabilidade aparente foram conduzidos para os equivalentes de pele e barreira intestinal utilizando o reagente dextran Alexa Fluor 488; 10 000 MW; anionic; fixable (Sigma Aldrich). Este foi diluído em solução Hank's e insertos vazios foram utilizados como controle. Para os equivalentes de barreira intestinal a concentração inicial utilizada foi de 0.2 mg/mL e para a pele 3D a concentração inicial foi de 1 mg/mL <sup>134,135</sup>. As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando um leitor de placa Inspire (Perkin Elmer) nos comprimentos de onda de 495 nm de excitação e 519 nm de emissão.

#### 5.8. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para o equivalente de barreira intestinal utilizando um microscópio Inspect F50 (Thermo Fisher), que possui um canhão de elétrons FEG Schottky e uma tensão de aceleração entre 500 V e 30 kV, no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do CNPEM.

Para esta análise, a barreira intestinal foi lavada com DMEM sem soro fetal bovino e fixada em solução contendo 2,5% glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio (0,1 mol/L e pH 7,4) com 3mmol/L de cloreto de cálcio em temperatura ambiente. As amostras fixadas foram estocadas a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato contendo cloreto de cálcio e desidratadas com uma série de diluições de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%). Por fim, as amostras foram secas utilizando um secador de ponto crítico Bal-Tec CPD-030 e cobertas com ouro utilizando um instrumento Bal-Tec MD020 (Leica). Elas foram montadas em stubs e analisadas utilizando o Inspect F50 em uma tensão de aceleração de 5 kV.

#### 5.9. Expressão gênica

A técnica de PCR quantitativa em tempo real foi empregada para avaliar a expressão gênica dos equivalentes a fim de acessar seu potencial fisiológico após a biofabricação. Esta técnica também foi empregada posteriormente para avaliar os painéis de assinatura gênica aplicados para a avaliação de cada desfecho toxicológico após a integração dos sistemas microfisiológicos e sua exposição à toxicantes.

Os equivalentes foram coletados e seu RNA extraído utilizando o kit PureLink<sup>™</sup> RNA mini kit (Thermo Fisher Scientific). A partir deste material biológico, o cDNA foi sintetizado realizando a transcrição reversa de 1000 ng de RNA utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Os experimentos de PCR quantitativa em tempo real foram realizados utilizando o sistema StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) e o kit TaqMan<sup>™</sup> Fast Universal PCR (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Os primers utilizados na etapa de caracterização dos equivalentes estão descritos na tabela 2. Após validados, GAPDH e HPRT1 foram utilizados para normalizar a expressão gênica. O *fold change* foi calculado usando o método 2-ΔΔCt conforme descrito<sup>136</sup>. Para avaliação de assinaturas genéticas após integração e tratamentos do sistema microfisiológico, empregamos painéis genéticos personalizáveis disponíveis em placas de 96 poços da Thermo Fisher Scientific. Os dados de expressão gênica foram comparados estatisticamente pelo teste de Mann Whitney (teste t não paramétrico; p < 0,05), utilizando o software Prism 5.01 (GraphPad Software).

#### 6. Escolha dos toxicantes e doses para cada desfecho toxicológico

As substâncias testadas como controles positivos nos experimentos realizados no sistema microfluídico foram acetaminofeno (paracetamol ou APAP), como controle positivo de toxicidade sistêmica, e formaldeído, como controle positivo de carcinogenicidade.

O acetaminofeno foi selecionado como controle positivo após o estudo do dossiê de registro da substância no site da ECHA<sup>86</sup> e de artigos científicos <sup>87–91</sup>. O formaldeído foi selecionado também com base no seu dossiê de registro no site da ECHA<sup>92</sup> e na sua página no banco de dados PubChem<sup>93</sup>, que traz informações sobre estrutura química, propriedades físico-químicas, além de dados de atividade biológica, segurança e toxicidade. Já o bisfenol A foi selecionado como controle positivo de disrupção endócrina com base em artigos científicos <sup>51,54–56,94–96</sup>.

Para definir qual a dose seria utilizada na aplicação tópica de cada uma dessas substâncias para os experimentos no chip, foi definido um racional de realização de medidas de viabilidade celular por MTT das culturas de fibroblastos e queratinócitos em monocamada, além de esferoides de fígado submetidos a tratamentos de diferentes doses das substâncias controles.

As doses iniciais testadas foram buscadas na literatura, a fim de definir a faixa de concentrações a ser testada.

As doses escolhidas para o tratamento em monocamada de fibroblastos e queratinócitos para o acetaminofeno foram 20mM, 2mM, 200  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M, 0,02 $\mu$ M, 0,002 $\mu$ M e para o formaldeído foram 200 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 12,5 $\mu$ M, 6,25 $\mu$ M, 3,125 $\mu$ M, 1,5625 $\mu$ M. Já as doses escolhidas para tratar os esferoides de fígado para o acetaminofeno foram 0,015 mM, 0,15 mM e 1,5 mM e para o formaldeído foram 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M.

A dose selecionada deveria manter a viabilidade celular em pelo menos 60% das células de fígado e de pele, mas de forma a garantir que houvesse modulação gênica dos marcadores toxicológicos.

Também foi investigada a permeação dos controles positivos selecionados no equivalente de pele de forma a garantir que as doses utilizadas nos tratamentos, que são realizados topicamente sobre os insertos com modelo de pele reconstruída, permitissem que os compostos atingissem o meio de cultura circulante no dispositivo microfluídico. Desta forma, os compostos absorvidos pela pele e disponíveis no meio de cultura podem atingir o fígado e barreira intestinal, permitindo que a mensuração dos possíveis danos causados pelas substâncias. Para isso, foi utilizada a ferramenta *Finite Dose Skin Permeation Calculator*, disponibilizada online pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC)<sup>97</sup>, em que é possível simular a administração tópica de diversas substâncias em pele 3D, sendo possível obter dados de absorção e, a partir disso, prever uma dose para tratamento. Esta calculadora estima fluxos, concentrações na pele e quantidades absorvidas de qualquer tamanho de dose aplicada à pele parcialmente ou totalmente hidratada. Os cálculos são baseados em: peso molecular (MW), o logaritmo de base 10 do coeficiente de partição octanol – água (logKow), ponto de fusão e ponto de ebulição do composto de interesse.

#### 7. Plataforma HUMIMIC chips

Os dispositivos microfluídicos utilizados neste projeto foram os HUMIMIC Chips3, da empresa alemã TissUse GmbH <sup>98</sup>. Trata-se de um dispositivo do tipo *multiorgan system*, que possui um fluxo ativo por ser acomplado a uma unidade controladora responsável por bombear ar comprimido para a geração de fluxo. Este dispositivo permite o cultivo de 3 equivalentes de órgãos interconectados. Os equivalentes são permeados pelo mesmo fluído, e expostos às mesmas substâncias, à semelhança do que ocorre com a circulação sistêmica humana. Dessa forma, no HUMIMIC Chip3, por exemplo, uma substância em teste pode ser aplicada topicamente na pele 3D e, se absorvida, chegará ao meio de cultura que seguirá para o compartimento que cultiva o equivalente de tecido hepático, sofrendo processos de metabolização primária e secundária <sup>63</sup>.

Foram integrados e cultivados em cada compartimento do chip o modelo de pele reconstruída, o equivalente de intestino e o equivalente de fígado. Todos os compartimentos são preenchidos por um fluído único que comunica as três câmaras, havendo, portanto, intercomunicação humoral entre os três tipos teciduais. Portanto, com o uso da tecnologia HUMIMIC Chips3 é possível, após o tratamento com substâncias-teste, avaliar parâmetros de absorção (pele), distribuição, metabolização do composto, além de avaliação dos efeitos toxicológicos, nos cultivos 3D. A Figura 3 apresenta uma visão geral da plataforma.



**Figura 3.** Dispositivo HUMIMIC Chips3, que contém três compartimentos de cultivo tecidual, e unidade controladora dos dispositivos microfluídicos.

# 8. Integração dos equivalentes de órgãos no HUMIMIC Chip3 e exposição tópica

Previamente à integração dos cultivos 3D nos HUMIMIC Chips3, estes foram lavados 5 vezes com PBS 1x e equilibrados com meio de cultura por 24 horas em estufa e sob fluxo.

A pele 3D foi integrada em um dos compartimentos maiores do HUMIMIC Chip3. Para manutenção da interface ar/líquido, foi adicionado meio de cultura Epilife suplementado na parte inferior do inserto de cultura contendo a pele. No outro compartimento maior foi inserido o equivalente de intestino, onde foi adicionado meio de cultura DMEM suplementado na parte apical, e na parte basolateral (inferior) do inserto foi adicionado meio de cultura Epilife suplementado. No compartimento menor foram inseridos 20 esferoides hepáticos, quantidade que corresponde a uma proporção de miniaturização relativa à pele, intestino e fígado <sup>99</sup>, e adicionado meio de cultura DMEM suplementado.

Para líquidos, assim como para sólidos, uma quantidade suficiente da substância deve ser aplicada topicamente na pele 3D para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita <sup>23,100</sup>. As substâncias testadas neste projeto foram de natureza hidrossolúvel. Sendo assim, todas foram diluídas em meio de cultura e 20 µl foram aplicados topicamente na pele 3D.

Os compartimentos de cultivo tecidual foram fechados e os chips contendo as culturas 3D foram conectados à unidade controladora e mantidos a 37C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Os seguintes parâmetros foram definidos na unidade controladora: pressão à 300 mbar, vácuo a -300 mbar e frequência com que o fluxo é impulsionado à 0,5 Hz. Todos os parâmetros foram escolhidos de modo a aproximar o fluxo de meio de cultura do fluxo sanguíneo do sistema circulatório humano, baseado em estudos científicos que utilizam a tecnologia da empresa TissUse <sup>38,63</sup>.



**Figura 4. A e B.** HUMIMIC Chips3 aberto e fechado, respectivamente, com barreira intestinal (à esquerda), equivalente de pele (centro) e esferóides de fígado (à direita) incluídos. **C.** HUMIMIC Chips3 conectados à unidade controladora. **D.** HUMIMIC Chips3 conectados à unidade controladora de CO2.

O primeiro experimento para cada desfecho toxicológico teve como objetivo checar a viabilidade dos equivalentes de pele, barreira intestinal e esferoides de fígado no chip com fluxo, após tratamento com o controle negativo e positivo por um período de 24h. Após esse período, os testes de viabilidade celular utilizando MTT foram realizados. O segundo experimento para cada desfecho toxicológico teve como objetivo extrair RNA dos equivalentes de pele, barreira intestinal e esferoides de fígado no chip com fluxo após tratamento com o controle negativo e positivo por um período de 24h. Após esse período, os RNAs das amostras foram extraídos e os cDNAs foram sintetizados. Cada experimento foi realizado em triplicata, portanto, foram utilizados 9 chips em cada desfecho estudado.