UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

JAQUELINE MARTINS GEHLEN

**Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos
associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de
fotoprocessos**

Ribeirão Preto
2018

JAQUELINE MARTINS GEHLEN

**Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos
associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de
fotoprocessos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio
Tedesco**

Ribeirão Preto
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

[Gehlen, Jaqueline Martins](#)

Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos. Ribeirão Preto, 2018.

115 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: [Tedesco, Antonio Claudio](#).

1. Engenharia Tecidual. 2. Equivalentes dérmicos. 3. Fotoprocessos. 4. Ftalocianina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jaqueline Martins Gehlen

Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, obrigada por todo aprendizado adquirido, orientações e oportunidade de fazer parte de um grupo maravilhoso.

À minha família, principalmente meus pais Gisela e Marcelo. Obrigada pelo amor, incentivo e por acreditarem no meu potencial. Sem o apoio de vocês esta etapa não seria possível!

Aos meus companheiros CNTianos, obrigada pela força, amizade e bons momentos que passamos juntos dentro e fora do laboratório. Vocês são ótimos! Um agradecimento especial às “girls do CNET” Mary, Nathy e Tácia.

Ao Apê 84 e suas moradoras, obrigada por me acolherem e serem minha casa durante estes dois últimos anos.

A todos meus amigos que torceram por mim mesmo de longe.

À Olímpia, técnica do laboratório, obrigada pela paciência, dedicação e atenção!

À Universidade de São Paulo, docentes e funcionários do Departamento de Química da FFCLRP e da FCFRP.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

GEHLEN, J. M. **Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos.** 2018. 114f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Processos fotodinâmicos aplicados a sistemas biológicos têm sido utilizados *in vitro* e *in vivo* como uma modalidade terapêutica seletiva e não invasiva em diversas áreas da saúde, incluindo a Medicina Regenerativa. Neste trabalho, propomos o seu estudo na reparação e regeneração tecidual, pela utilização de um fármaco fotossensibilizante associado a um sistema de veiculação e sua ação fotobiológica, monitorada pela atividade celular (sistemas 2D e 3D). Para superar limitações do modelo celular convencional em monocamada, tais como baixa interação célula-célula e célula-matriz extracelular, propomos o uso de modelos tridimensionais de pele (denominados equivalentes dérmicos). Desta forma, algumas condições existentes *in vivo* podem ser mimetizadas *in vitro*, conduzindo à observação de um comportamento mais próximo à situação real. Os equivalentes dérmicos foram preparados através do cultivo celular em uma matriz de colágeno tipo I, que foi extraído de tendões da cauda de ratos *Wistar*. Foram escolhidas duas linhagens celulares para a padronização dos modelos tridimensionais: fibroblastos NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658TM) e células-tronco humanas HBMS (Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, ATCC® PCS-500-012TM). Os ED produzidos foram monitorados por um período de 14 dias para o estudo do perfil de cinética de contração e também observamos a formação da matriz tridimensional de colágeno através da microscopia óptica. O perfil de contração observado é mais acentuado nos primeiros dias e tende a se estabilizar no final do período analisado. Fatores como concentração celular e de colágeno interferem nesta cinética. Estudos de histologia, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal também foram realizados para melhor caracterizar o modelo. Em uma segunda etapa deste trabalho, estudos de fotobiomodulação foram conduzidos nestes modelos celulares, associando-se o uso de fotoprocessos com luz visível de baixa intensidade (doses 70, 140 e 300 mJ/cm²) e o fármaco fotossensibilizante ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc), veiculado em um sistema de liberação nanoestruturado clássico do tipo nanoemulsão. A expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas associadas a eventos biológicos de remodelação da matriz extracelular, foi avaliada através da técnica de zimografia.

Palavras-chave: Engenharia Tecidual, Equivalentes Dérmicos, Fotoprocessos, Ftalocianina, Reparação e Regeneração Tecidual.

ABSTRACT

GEHLEN, J. M. **Development and characterization of dermal equivalents associated with photosensitizer drug for photoprocesses studies**. 2018. 114f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Photodynamic Process applied to biological systems has been used *in vitro* and *in vivo* as selective and noninvasive modality in several areas including Regenerative Medicine. In this research project, we propose to study wound healing and tissue regeneration, induced by the use of a photosensitizer drug into 2D and 3D cellular models. In order to perform experiments with high level of biological complexity, we propose to use three-dimensional tissue models (called dermal equivalents). The aim is to mimic *in vitro*, the conditions existing in *in vivo*, such as cell-cell contact and cell-extracellular matrix interactions, which cannot be observed in monolayer cultures. The dermal equivalents were obtained combining fibroblasts cells NIH /3T3 (ATCC® CRL-1658TM) or Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (ATCC® PCS-500-012TM) with collagen matrix. Collagen type I was obtained from tail tendons of *Wistar* rats. The three-dimensional model was monitored over 14 days and to study the kinetic contraction, the diameter of each disc was measured. Also, the collagen matrix was evaluated by bright field microscopy. The classical profile observed is more pronounced in the early days and tends to stabilize at the end of the period. This kinetic can be modified by the concentration of cells and collagen. Histological analyses, scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy were also important to describe this model. Second, photobiology tests were performed, combining low-intensity laser (70, 140 e 300 mJ/cm²) and a classical Chloro Aluminum Phthalocyanine photosensitizer drug encapsulated into polymeric nanoemulsion. Matrix metalloproteinases (MMPs) expression in the cell culture was evaluated by zymography. These are endopeptidases associated with wound healing and remodeling processes.

Keywords: Tissue Engineering, Dermal Equivalents, Photoprocess, Phthalocyanine, Wound healing and Tissue Regeneration.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
SUMÁRIO.....	xii
 I- INTRODUÇÃO.....	 1
1.1- Anatomia da pele e o processo de cicatrização	1
1.2- O colágeno e a matriz extracelular	4
1.3- Engenharia tecidual e o modelo celular tridimensional de pele.....	7
1.4- Os fármacos fotossensibilizantes: Ftalocianinas	10
1.5- Fotobiomodulação: Uso dos Processos Fotodinâmicos	13
1.5.1- Mecanismos moleculares da ação da luz de baixa intensidade.....	15
1.6- Nanotecnologia e o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos	16
1.7- As Metaloproteínas de Matriz (MMPs)	18
II- OBJETIVOS.....	21
III- MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1- Cultura celular	22
3.1.1- Protocolo de cultivo celular dos fibroblastos BJ	22
3.1.2- Protocolo de cultivo celular dos fibroblastos NIH/3T3	22
3.1.3- Protocolo de cultivo celular das células-tronco HBMS	23
3.1.4- Micrografias das culturas celulares	24
3.1.5- Procedimento para contagem celular (Azul de Tripan)	24
3.2- Sistema de veiculação nanoestruturado.....	25
3.2.1- Preparo da nanoemulsão de ftalocianina.....	25
3.2.2- Caracterização físico-química da nanoemulsão	25
3.3- Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT	26
3.4- Colágeno tipo I.....	27
3.4.1- Extração do colágeno do tipo I.....	27
3.4.2- Diálise da solução de colágeno	27
3.4.3- Dosagem do colágeno	27
3.5- Protocolo de preparo dos Equivalentes Dérmicos (ED).....	28
3.5.1- Monitoramento dos equivalentes dérmicos.....	29
3.6- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos	29
3.7- Microscopia Confocal (monocamada)	30

3.8- Histologia	30
3.9- Microscopia Eletrônica de Varredura	31
3.10- Zimografia	31
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1- Acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão de CIAIPc	33
4.2- Ensaio de biocompatibilidade da nanoemulsão	35
4.3- Ensaio de citotoxicidade da nanoemulsão de CIAIPc	36
4.4- Microscopia Confocal em monocamada	39
4.5- Extração do colágeno tipo I	40
4.6- Quantificação do colágeno do tipo I	43
4.7- Preparo dos Equivalentes Dérmicos e determinação da cinética de contração	44
4.8- Microscopia Eletrônica de Varredura	50
4.9- Histologia	52
4.10- Estudos com os Equivalentes Dérmicos: fatores que influenciam a cinética de contração	54
4.10.1- Influência da concentração celular na contração dos ED	54
4.10.2- Influência do colágeno na cinética de contração dos ED	58
4.10.3- Comportamento da linhagem celular na cinética de contração dos ED	60
4.10.4- Influência da concentração de colágeno na cinética de contração dos equivalentes dérmicos	63
4.11- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos	69
4.11.1- Tratamento dos ED com nanoemulsão de CIAIPc 10 µmol/L e luz de baixa intensidade	69
4.11.2- Comportamento dos equivalentes dérmicos na presença de CIAIPc sem irradiação	72
4.11.3- Tratamento dos ED com nanoemulsão de CIAIPc 3µmol/L e luz de baixa intensidade	74
4.11.4- Zimografia: Avaliação da expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9	77
4.12- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos com a linhagem de células-tronco HBMS	79
V- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

I- INTRODUÇÃO

1.1- Anatomia da pele e o processo de cicatrização

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e ela está histologicamente organizada em três camadas superpostas: epiderme (camada mais externa), derme e hipoderme, além dos anexos como pelos, glândulas sudoríparas e sebáceas. Sua principal função está relacionada com a proteção dos tecidos subjacentes e também regulação da temperatura corporal (KANITAKIS, 2002; WICKETT e VISSCHER, 2006; BOUWSTRA e PONEC, 2006).

A epiderme compõe a camada mais externa da pele e é um tecido estratificado que está em constante renovação. Ela geralmente é subdividida em 5 estratos, que são organizados de acordo com o grau de diferenciação dos queratinócitos: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (mais externo). A etapa final na maturação dos queratinócitos está associada a mudanças na sua estrutura e composição e ocorre a sua transformação em corneócitos. Os corneócitos são células anucleadas e achatadas constituídas principalmente de queratina e água, envolvidas por lipídeos lamelares. Por isso, o estrato córneo funciona como uma barreira à perda de água e à entrada de moléculas estranhas, impedindo a desidratação e protegendo o organismo do ambiente externo, respectivamente. Na epiderme também existem os melanócitos e algumas células do sistema imunológico, como as células de Langerhans (WICKETT e VISSCHER, 2006; BROHEM et al., 2011; BOUWSTRA e PONEC, 2006).

A derme é um tecido conjuntivo composto principalmente de fibroblastos, elementos fibrilares (como colágeno tipo I e elastina) e outros elementos da matriz extracelular, como por exemplo, proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e outros (VENUS, WATERMAN e MCNAB, 2010; WONG, MCGRATH e NAVSARIA, 2007). Há também a presença de vários apêndices, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, além de terminações nervosas e vasos sanguíneos e linfáticos.

Abaixo da derme, encontra-se a hipoderme que é composta principalmente de células adiposas. O tecido adiposo proporciona proteção mecânica, mantém a temperatura corporal regulada e funciona como um reservatório de energia (BARONI et al., 2012).

Figura 1 - Camadas da pele e seus constituintes celulares. A pele é dividida em epiderme, derme e hipoderme. Imagem adaptada de (BROHEM et al., 2011).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que compreende uma sequência de eventos celulares e moleculares para que ocorra a restauração do tecido lesado e será brevemente descrito aqui. Alguns autores dividem o processo de cicatrização em 5 fases principais que podem se sobrepor de forma contínua e temporal:

1. Coagulação
2. Inflamação
3. Proliferação
4. Contração da ferida
5. Remodelação

A fase de coagulação inicia-se imediatamente após o surgimento da ferida. A agregação plaquetária e a coagulação formam um tampão rico em fibrina, que age como uma barreira contra a invasão de microrganismos e funciona como uma matriz provisória para a migração celular. Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende da liberação de inúmeros mediadores químicos e migração de células inflamatórias como leucócitos

polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos que irão fagocitar bactérias, corpos estranhos e fragmentos celulares (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009)

A fase proliferativa é responsável pelo fechamento da ferida propriamente dita, e compreende três eventos: reepitelização, fibroplasia e angiogênese. A reepitelização inicia-se horas após a lesão com a migração de células epiteliais (queratinócitos) a partir das bordas da ferida e dos apêndices epidérmicos. A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz que irá compor o tecido de granulação. Nesta etapa, os fibroblastos desempenham um papel crítico na síntese da nova matriz, produzindo colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases (MANDELBAUM , DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003). Ocorre também o aumento da permeabilidade vascular e a produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já pré-existentes (processo denominado angiogênese) para suprir a demanda de nutrientes e oxigênio do tecido em crescimento (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

A contração da ferida é caracterizada pelo movimento centrípeto das bordas da ferida, reduzindo a quantidade e o tamanho da cicatriz desordenada. Este evento é importante, principalmente, para o fechamento das feridas classificadas como “abertas” (MARIA DE FÁTIMA , ANDRADE e MORIYA, 2008).

Seguindo o processo de maturação da ferida, ocorre a fase de remodelação que é caracterizada principalmente pelo aumento da resistência do tecido. Primeiramente ocorre a mudança do tipo de colágeno que compõem a matriz. Nas fases iniciais do processo de cicatrização ocorre o estímulo para síntese de colágeno tipo III, que posteriormente é substituído pelo tipo I. Há, portanto, um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno por ação de collagenases (tipo de metaloproteinases de matriz). (ISAAC et al., 2010) (MARIA DE FÁTIMA , ANDRADE e MORIYA, 2008).

Juntamente com esta substituição, ocorre uma alteração na organização das fibrilas de colágeno, as quais mudam sua disposição de fibras paralelas para fibras entrelaçadas ao longo das linhas de tensão, devido ao aumento das ligações transversais. Em suma, a fase de remodelamento da cicatriz envolve eventos sucessivos de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno (BALBINO , PEREIRA e CURI, 2005).

Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas. Imagem retirada de (ISAAC et al., 2010).

1.2- O colágeno e a matriz extracelular

O colágeno é a proteína estrutural mais abundante presente na matriz extracelular. Ele é encontrado nos tecidos conjuntivos, tais como, pele, cartilagens, tendões, veias, ossos, dentes, músculos e camada córnea dos olhos (FERREIRA DA SILVA e BARRETTO PENNA, 2012).

A molécula de colágeno é constituída de três cadeias α polipeptídicas paralelas, cada uma contendo uma sequência característica de aminoácidos e dispostas em uma conformação helicoidal denominada poliprolina tipo II. Estas três cadeias se enovelam umas sobre as outras formando uma tripla hélice rígida com orientação para a direita. Esta conformação é estabilizada por ligações de hidrogênio que podem ser quebradas por desnaturação química ou térmica, resultando no desempacotamento da molécula de colágeno (SHOULDERS e RAINES, 2009; KNAGGS, 1992).

Por sua vez, as cadeias α da molécula de colágeno são compostas por uma sequência repetitiva de 3 aminoácidos, sendo a glicina o terceiro resíduo de aminoácido encontrado (XYGly). Os aminoácidos mais comuns nas posições X e Y são a 2S-prolina (28%) e a (2S,

4R)-4-hidroxiprolina (38%) respectivamente, formando a sequência tripla de aminoácidos (ProHypGly) mais comum encontrada no colágeno (10.5%) (SHOULDERS e RAINES, 2009; KNAGGS, 1992).

A estrutura de tripla hélice é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o NH do resíduo de glicina com a carbonila (C=O) do polipeptídeo adjacente. Os resíduos pequenos de glicina encontram-se arranjados no interior da tripla hélice, enquanto que os outros aminoácidos geralmente estão dispostos no exterior. Além disso, a repulsão estérica entre uma prolina e uma hidroxiprolina gera um ângulo (C-N) fixo que permite que as cadeias α se entrelacem formando a tripla hélice (HOLMES et al., 2017).

As triplas hélices de colágeno individuais são denominadas de tropocolágeno, que se organizam de forma complexa para formar fibrilas e fibras de colágeno encontradas nos tecidos (Figura 3).

Na maioria dos tipos de colágeno (principalmente nos fibrilares), as moléculas produzidas são secretadas na forma de procolágeno, que possui peso molecular maior que a forma processada encontrada normalmente na matriz extracelular. Nestas moléculas precursoras (procolágeno), cada cadeia polipeptídica possui duas estruturas globulares de peptídeos contendo NH₂- e COOH-terminais nas extremidades, denominados propeptídeos (KNAGGS, 1992).

Na matriz extracelular, ocorre a ação de pelo menos duas peptidases diferentes (C- e N-peptidases) para clivar os propeptídeos e transformar o procolágeno em colágeno.

Estas estruturas globulares ligadas ao procolágeno ocupam um grande espaço ao redor da molécula gerando impedimento estérico, por isso, para que ocorra o processo de fibrilogênese (formação das fibrilas de colágeno) é necessária a ação destas enzimas (FERREIRA DA SILVA e BARRETTO PENNA, 2012; KNAGGS, 1992).

O alinhamento das moléculas de colágeno e sua organização supramolecular ocorrem espontaneamente, porém a força e resistência das fibras de colágeno somente são obtidas após o estabelecimento de ligações covalentes entre as moléculas. As ligações cruzadas mais comuns encontradas entre as moléculas de colágeno tipo I ocorrem nos resíduos de lisina e hidroxilisina. Primeiramente, ocorre a síntese de resíduos de aldeído, através da reação enzimática catalisada pela ação de uma lisil oxidase (LOX), na qual ocorre a remoção de um grupamento ϵ -amino dos resíduos de lisina e hidroxilisina. Este aldeído então reage com o grupo amino de uma molécula de colágeno adjacente formando uma ligação cruzada do tipo base de Schiff (YAMAUCHI e SHIIBA, 2008; RUCKER e MURRAY, 1978).

Figura 3 – Processo de formação e organização das fibras de colágeno. Imagem retirada de (FERREIRA DA SILVA e BARRETTO PENNA, 2012).

1.3- Engenharia tecidual e o modelo celular tridimensional de pele

A engenharia tecidual é um campo multidisciplinar formado pela interação das ciências da vida, ciências físicas e engenharia, cujo objetivo principal é o desenvolvimento de opções terapêuticas para a reparação, manutenção ou substituição da função biológica (LANGER e VACANTI, 2016).

Embora o cultivo de células *in vitro* seja realizado há muitos anos, a possibilidade de cultivar tecidos tridimensionais complexos é recente (Madureira et al., 2010). A cultura em monocamada é uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento científico, porém, as respostas obtidas nem sempre são satisfatórias, uma vez que o comportamento das células em monocamada quase sempre difere daquele observado *in vivo*. Uma das limitações deste método experimental é a falta de interações célula-célula e célula-matriz (HERRMANN et al., 2014). Já nos modelos de cultura celular 3D, o contato da matriz extracelular com as culturas celulares simples ou mistas, permitem um entendimento muito mais complexo do processo.

A pele foi o primeiro tecido humano a ser reconstruído *in vitro* através da engenharia tecidual, por volta de 1980. Bell e colaboradores (BELL, IVARSSON e MERRILL, 1979; BELL et al., 1983) foram os pioneiros na preparação de modelos com estrutura tridimensional (3D). O modelo proposto foi uma combinação de fibroblastos, queratinócitos e matriz de colágeno, formando duas camadas: uma derme (composta por fibroblastos e colágeno) e uma epiderme (composta por queratinócitos). Este modelo permitiu o estudo de funções dos fibroblastos, como contração e remodelamento da matriz extracelular, que não podiam ser avaliadas no modelo de cultura em monocamada, além de ajudar a entender as interações de derme-epiderme (SMALLEY et al., 2008; BROHEM et al., 2011).

A vantagem do modelo de Equivalente Dérmico (3D) é que várias interações célula-célula e célula-matriz, existentes *in vivo*, são recuperadas *in vitro*, conduzindo à observação de um comportamento mais próximo à situação real. Além disso, as células são morfolologicamente mais semelhantes às células *in vivo*, pois formam matrizes tridimensionais especializadas. Atualmente, os Equivalentes Dérmicos podem ser utilizados como substitutos da pele humana em diferentes áreas tecnológicas, como na biologia molecular, farmacologia, dermatologia (cosméticos) e medicina regenerativa (PRIMO e TEDESCO, 2013; BROHEM et al., 2011; Cheung et al., 2015).

Na área da medicina regenerativa, por exemplo, há muito interesse para o desenvolvimento de substitutos cutâneos sintéticos ou biológicos que possam ser utilizados no

tratamento de feridas crônicas ou em pacientes que tiveram grandes perdas de pele (queimaduras, traumatismos, doenças autoimunes, etc.). Atualmente estão disponíveis os aloenxertos (derivados da pele de outros indivíduos), xenoenxertos (derivados da pele de animais) ou os materiais sintéticos, desenvolvidos pela engenharia tecidual (NYAME , CHIANG e ORGILL, 2014; HUGHES et al., 2016; DEBELS et al., 2015a; FERREIRA et al., 2011). Na tabela abaixo foram reunidos os principais substitutos cutâneos encontrados na literatura.

Tabela 1 - Principais substitutos cutâneos encontrados comercialmente no mundo. *EpiSkin™ produz tecidos humanos somente para análises *in vitro*.

Produto	Composição	
Acelular		
Integra®	Colágeno bovino e glicosaminoglicano (condroitina-6-sulfato), recoberto por fina lâmina de silicone	
Biobrane®	Rede de náilon preenchido com colágeno porcino tipo I, coberto por fina lâmina de silicone	
Alloderm®	Matriz dérmica derivada de pele humana de cadáver	
Matriderm®	Matriz de colágeno e elastina	
Celular	Tipo celular	Matriz
TransCyte®	Fibroblastos neonatais	Membrana de silicone-nylon ligada a peptídeos de colágeno (semelhante à Biobrane®)
ICX-SKN®	Fibroblastos neonatais	Fibrina
Hyalograft-3D®	Fibroblastos autólogos	Fibras de ácido hialurônico esterificadas. Coberto por uma membrana de silicone
Apligraf®	Fibroblastos e queratinócitos neonatais	Colágeno tipo I bovino

Produto	Composição	
Orcel®	Fibroblastos e queratinócitos humanos	Colágeno tipo I bovino
Dermagraft®	Fibroblastos neonatais	Matriz absorvível de ácido glicólico (poliglactina 910)
EpiCel®	Queratinócitos autólogos	Cultivados em uma camada de fibroblastos de rato (3T3)
TheraSkin®	Fibroblastos e queratinócitos humanos	Aloenxerto fabricado a partir de células humanas doadas
*EpiSkin™	Queratinócitos humanos	Matriz de colágeno

Fonte: (NYAME , CHIANG e ORGILL, 2014; HUGHES et al., 2016; DEBELS et al., 2015a; FERREIRA et al., 2011).

Existe também um grande interesse pelas indústrias farmacêuticas, cosméticas e químicas em utilizar modelos celulares tridimensionais e testes *in vitro* durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Estima-se que de 5.000 a 10.000 moléculas em triagem para o desenvolvimento de um novo fármaco, apenas uma possui aprovação final pela Food and Drug Administration (FDA) e esta pesquisa gera um investimento de mais de 1 bilhão de dólares às indústrias farmacêuticas, grande parte desse custo devido a testes de eficácia e segurança em animais (LEE et al., 2012).

Além disso, há uma tendência mundial em seguir o princípio dos 3R's (Reduction ou redução, Refinement ou refinamento, Replacement ou substituição) no que diz respeito à utilização de animais em práticas de pesquisa e ensino e faz-se necessário encontrar alternativas cientificamente válidas para os testes feitos em animais.

No Brasil, atualmente existem vinte e quatro métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Em 2014, através da Resolução Normativa nº18/2014, o CONCEA reconheceu 17 métodos validados pela Organização pela Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês Organisation for Economic Cooperation and Development) e estabeleceu um prazo de até cinco anos (portanto, até 2019) como limite para a substituição obrigatória dos métodos

originais por métodos alternativos. Destes, dois guias (OECD 431 e OECD 439) utilizam a epiderme humana reconstituída (RHE). Posteriormente, a resolução normativa nº31/2016 incluiu mais sete métodos (BRASIL, 2014; BRASIL 2016).

Porém, um grande problema limitante é que estes modelos alternativos de pele são produzidos comercialmente somente no exterior e por se tratar de um material biológico seu transporte torna-se difícil principalmente devido a questões de logísticas e alfandegárias. O produto mais conhecido é o fabricado pela marca francesa EpiSkinTM, que possui modelos de pele reconstituída (derme e epiderme), epiderme reconstituída e outros tipos de epitélio (córneo, vaginal, mucosa oral). No Brasil, a criação do RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos) em 2012 alavancou as pesquisas neste âmbito, e atualmente existem Laboratórios Centrais e Associados desenvolvendo projetos de pesquisa no desenvolvimento e disseminação de modelos alternativos como, por exemplo, a pele reconstituída.

Neste contexto, a pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo nosso grupo, no intuito de recriar modelos tridimensionais, como os equivalentes dérmicos, seguem as tendências mundiais de desenvolver novos protocolos para engenharia tecidual.

1.4- Os fármacos fotossensibilizantes: Ftalocianinas

Os fármacos fotossensibilizantes são compostos químicos que absorvem a energia luminosa (em comprimentos de ondas específicos) induzindo a formação de moléculas em estados excitados, que após seguirem um complexo mecanismo de reações fotoquímicas clássicas levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou outras espécies ativas como oxigênio singlete, durante o processo fotodinâmico (FOOTE, 1991; MEHRABAN e FREEMAN, 2015; ROBERTSON, EVANS e ABRAHAMSE, 2009).

Entre as características ideais de um fotossensibilizante podemos citar a pureza química, seletividade pelo tecido alvo, intervalo pequeno entre a administração do fármaco e o acúmulo máximo no tecido, farmacocinética favorável (tempo de meia-vida curto), características fotofísicas favoráveis e baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade) (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010; SIMPLICIO, MAIONCHI e HIOKA, 2002).

Quanto às características fotofísicas favoráveis, um fator importante é o comprimento de onda da luz. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior é o seu grau de penetração no tecido, e conseqüentemente, maior eficiência no tratamento do tecido (SIMPLICIO, MAIONCHI e HIOKA, 2002). Portanto, as drogas desenvolvidas para uso em processos fotodinâmicos devem ser cromóforos que absorvam na

região próxima ao infravermelho, onde ocorre a maior absorção. Porém, acima de 800 nm ocorre a absorção da radiação pela água, restringindo o comprimento de onda a este limite superior (MEHRABAN e FREEMAN, 2015).

A primeira geração de fotossensibilizadores utilizada em processos fotodinâmicos foram os derivados de hematoporfirina. Embora estes fotossensibilizadores tenham sido extensivamente utilizados em estudos clínicos e feito sucesso, essa primeira geração de fotossensibilizadores apresentou algumas desvantagens como baixa seletividade, fotossensibilidade cutânea a longo prazo e composição indefinida dos produtos comerciais, que eram vendidos como uma mistura complexa da hematoporfirina (JIANG et al., 2014). Neste contexto, surgiram os fotossensibilizadores de segunda geração, como as porfirinas modificadas, ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas.

As ftalocianinas vêm sendo consideradas excelentes fármacos fotossensibilizantes com aplicação nos processos fotodinâmicos devido à sua estabilidade físico-química, pureza química e alta capacidade de gerar oxigênios reativos (EROs). Possuem vantagens comparando-se aos compostos de primeira geração pelo fato de possuírem uma alta taxa de absorção de luz nos comprimentos de onda de 670 a 780 nm, exatamente na janela terapêutica (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; BENOVOV, 2015), além de baixa toxicidade *in vitro*.

As ftalocianinas podem apresentar uma variedade de íons metálicos em sua estrutura química. A associação com metais, mais usualmente o alumínio e o zinco, promovem melhores propriedades fotofísicas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Figura 4 - Estrutura química da ftalocianina de cloro alumínio ($C_{32}H_{16}AlClN_8$). Imagem retirada de (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

A interação do fármaco fotossensível e luz monocromática geram uma complexa resposta fotoquímica e fotofísica que pode ser explicada pelo Diagrama de Jablonski, representado na figura abaixo (Figura 5).

Figura 5 - Diagrama de Jablonski representando os processos fotofísicos e fotoquímicos que ocorrem durante os processos fotodinâmicos. Imagem adaptada de (CALIXTO et al., 2016).

Quando um fóton é direcionado à uma molécula, ele pode ser absorvido, refletido ou transmitido. Se for refletido ou transmitido não ocorre mudança alguma na energia da molécula, porém se for absorvido, ocorre aumento de sua energia de orbital molecular.

O fármaco fotossensibilizante que inicialmente encontra-se no estado fundamental possui dois elétrons de spin opostos situados no orbital molecular de menor energia.

Após absorção da energia luminosa (fótons), um destes elétrons passa a habitar um orbital de maior energia, porém ainda mantém o seu spin. Este é o primeiro estado excitado da molécula fotossensibilizante e possui tempo de vida muito curto (na ordem de nanossegundos), podendo retornar ao seu estado fundamental (estado singlete) através da emissão de fluorescência ou pela conversão interna em calor.

A molécula em seu estado singlete excitado pode ainda sofrer um processo denominado cruzamento intersistemas, na qual o spin do elétron excitado é invertido dando origem ao estado triplete excitado (elétrons com spin paralelos). Este estado triplete excitado é mais estável e possui tempo de vida maior (microssegundos).

O fármaco fotossensibilizante no seu estado triplete excitado pode então desencadear reações fotoquímicas de dois tipos, Tipo I e Tipo II:

No mecanismo tipo I, ocorre a transferência de um próton ou elétron para moléculas biológicas, formando radicais aniônicos ou catiônicos, respectivamente. Posteriormente, estes radicais podem reagir com o oxigênio molecular presente no meio para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxidos de hidrogênio, ânion superóxidos, etc. No mecanismo tipo II, o fármaco fotossensibilizante transfere a sua energia diretamente para um oxigênio molecular, formando oxigênio singlete excitado, espécie altamente reativa que pode oxidar vários substratos biológicos (CALIXTO et al., 2016; CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004).

1.5- Fotobiomodulação: Uso dos Processos Fotodinâmicos

Fotobiomodulação pode ser caracterizada como o efeito da utilização de luz monocromática de baixa potência, com a intenção de estimular ou inibir funções biológicas e que não resulta em danos irreversíveis ao tecido (LIU et al., 2014; MA et al., 2012). Nas últimas décadas, numerosos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da terapia com laser de baixa potência. Como exemplos podemos citar a estimulação do crescimento neuronal e aumento da função neuronal pós-trauma, efeitos protetores em cardiomiócitos pós-isquemia, regeneração de nervos e músculos, modulação do sistema imune, remodelação e reparo do tecido ósseo (ALGHAMDI, KUMAR e MOUSSA, 2012; PEPLOW, CHUNG e BAXTER, 2010; PRINDEZE, MOFFATT e SHUPP, 2012).

Embora os mecanismos biológicos a respeito dos efeitos bioestimulatórios da luz de baixa potência não sejam totalmente elucidados, diversos autores têm reportado que esta terapia é capaz de modular processos celulares metabólicos e estudos indicam o seu potencial regenerativo em tecidos biológicos (ALGHAMDI, KUMAR e MOUSSA, 2012; LAU et al., 2015; JESUS, SAEKI e TEDESCO, 2016a; DOURADO et al., 2015; FARFARA et al., 2015; TURRIONI et al., 2017; AHMED e SAYED, 2012; DAWOOD e SALMAN, 2013; NOVAES et al., 2014; MARTINS et al., 2017; ELSON e FORAN, 2015). Além disso, estudos apontam que esta modalidade possui efeitos celulares na proliferação de fibroblastos, matriz extracelular, produção de colágeno, formação do tecido de granulação e redução da resposta inflamatória, tornando-se uma terapia alternativa para os processos de cicatrização e reparação tecidual (DEYHIMI et al., 2016).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica não invasiva, que embora tenha sido originalmente desenvolvida visando à terapia do câncer em suas diversas

formas, tem ficado cada vez mais evidente sua aplicação em diversas áreas da medicina como na cardiologia, imunologia, oftalmologia, odontologia e dermatologia (BENOV, 2015). O mecanismo se dá pela junção de três componentes: agente fotossensibilizante, luz e oxigênio molecular. A técnica, em geral, consiste na administração tópica ou sistêmica de um agente fotossensibilizante que se acumula nas células alvo. Em seguida, o tecido é exposto à luz de comprimento de onda específico, que coincide com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante aplicado. Os fotossensibilizantes são então ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010; TOREZAN, NIWA e FESTA NETO, 2009).

Sabe-se que altas concentrações de EROs apresentam efeitos citotóxicos levando a apoptose celular (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Entretanto, em concentrações baixas, ou seja, em concentrações fisiológicas, EROs têm sido apontados como sinalizadores e estimuladores de processos biológicos, como na diferenciação celular, modulação de canais de íons, aumento do influxo de cálcio, proliferação celular e ativação de kinases (MAPK) (PRINDEZE, MOFFATT e SHUPP, 2012).

Lubart e colaboradores estudaram a hipótese de que a fotobioestimulação poderia ser mediada pela produção de pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio e para tal, concentrações baixas de derivados de hematoporfirina foram adicionados às culturas de fibroblastos que foram irradiadas com laser de HeNe. O resultado obtido foi um aumento da proliferação celular (LUBART et al., 1995; LUBART et al., 2005). Outros estudos posteriores também demonstraram este potencial estimulatório (FARIA et al., 2015; SILVA et al., 2004; DEYHIMI et al., 2016; MENDOZA-GARCIA et al., 2015; SPERANDIO et al., 2010; JAYASREE et al., 2001; SAHU et al., 2013).

Além disso, estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram que a combinação sinérgica entre laser de baixa potência, fármaco fotossensibilizante e um sistema de veiculação nanoestruturado apresentam potencial terapêutico no processo de reparação tecidual. Utilizando um modelo *ex vivo*, Jesus et al. observou um aumento de mais de 20% na produção de colágeno e elastina, 14 dias após o tratamento (JESUS, SAEKI e TEDESCO, 2016b). Anteriormente, Primo et al. já havia estudado os efeitos bioestimulatórios do uso de laser de baixa potência e o fotossensibilizante cloro alumínio de ftalocianina e obteve alguns resultados preliminares (PRIMO et al., 2011; PRIMO et al., 2012).

Durante o processo, a seletividade e eficácia do tratamento dependem, entre outros fatores, da área exposta à luz e do acúmulo preferencial do agente fotossensibilizante nas células alvo (ALLISON et al., 2008; MEHRABAN e FREEMAN, 2015), sendo este um

obstáculo que tem levado ao estudo de variados sistemas de veiculação. Recentemente, os avanços na tecnologia farmacêutica (nanotecnologia) contribuíram para o desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos fotossensibilizantes com aplicação nos processos fotodinâmicos, como por exemplo, as nanoemulsões de cloro alumínio ftalocianina (PRIMO et al., 2012; PRIMO e TEDESCO, 2013).

1.5.1- Mecanismos moleculares da ação da luz de baixa intensidade

A energia luminosa pode ser absorvida pelas células através de seus cromóforos endógenos. Podemos citar como exemplos as porfirinas, riboflavinas, citocromos mitocondriais e o sistema NADPH oxidase presente na membrana plasmática. Esta interação depende do espectro de absorção destes cromóforos, comprimento de onda da fonte luminosa e parâmetros como intensidade e dose da luz.

Estes cromóforos agem como fotossensibilizantes, transferindo a energia para moléculas de oxigênio presentes no meio e produzindo espécies reativas de oxigênio. Em baixas concentrações (níveis não citotóxicos) estas moléculas de EROs, podem produzir efeitos positivos nas células (LUBART et al., 2005).

Os mecanismos do laser de baixa intensidade foram elucidados a nível molecular por Karu e colaboradores em 1988 que sugeriram a cadeia respiratória como sendo o primeiro fotorreceptor celular. A absorção de luz visível monocromática por componentes celulares como citocromo c e citocromo c oxidase pode ocasionar a ativação da cadeia respiratória, gerando mudanças no estado redox citoplasmático e na própria mitocôndria (KARU, 1988). A ativação de canais iônicos como a bomba de prótons Na^+/H^+ situados na membrana citoplasmática podem desencadear uma cascata de eventos celulares. Karu e colaboradores correlacionaram a transmissão de sinais de aumento da mitose celular com o controle intracelular do pH, ou seja, o efeito estimulatório do laser de baixa potência pode ser explicado pela rápida alcalinização do citoplasma que ocorre como resultado da fotoativação da cadeia respiratória. Além disso, o aumento intracelular de H^+ pode causar a ativação de outros transportadores de membrana como Na^+/K^+ e Ca^{2+} . O íon Ca^{2+} é citado como componente celular envolvido em diversos processos e por isto, sugere-se também que seu aumento em concentração esteja envolvido em etapas da fotobioestimulação (PRINDEZE, MOFFATT e SHUPP, 2012).

1.6- Nanotecnologia e o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos

Nas últimas três décadas, a nanotecnologia tem sido discutida como uma nova área multidisciplinar da ciência, que contribuiu para a ascensão da pesquisa e desenvolvimento de nanoestruturas e nanomateriais com aplicações biomédicas e farmacêuticas, mais especificamente, sistemas de veiculação de fármacos, diagnósticos e biomarcadores (GESZKE-MORITZ e MORITZ, 2016).

Muitos fatores podem contribuir para o fracasso de uma terapia: baixa solubilidade do fármaco, limitando as vias de administração; concentração insuficiente do fármaco no tecido-alvo, ocasionada pela baixa absorção ou rápida metabolização e/ou eliminação; biodistribuição inespecífica (baixa seletividade) do fármaco para outros órgãos, podendo causar toxicidade; etc.(MEHNERT e MADER, 2012a).

Nos últimos anos, os avanços na nanomedicina têm proporcionado o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos, contribuindo para aumento da eficácia terapêutica e diminuição de efeitos adversos (KULKARNI e FENG, 2013). Isto significa que o destino final do fármaco não depende mais somente das propriedades intrínsecas ao fármaco, mas agora, principalmente das propriedades do sistema carreador, que deve permitir uma liberação controlada e alvo-específica, de acordo com a terapia desejada (MEHNERT e MADER, 2012b). Outras vantagens destes nanocarreadores são: proteção dos fármacos da degradação antecipada no ambiente biológico, aumento da absorção por um tecido específico (seletividade), maior biodisponibilidade e tempo de retenção (KUMARI , YADAV e YADAV, 2010).

De acordo com a Organização Internacional para Padronização (em inglês, International Organization for Standardization – ISO), nanopartículas são materiais com as três dimensões externas na nanoescala de 1 – 100 nm. Porém, no campo da nanomedicina são consideradas nanopartículas as partículas com tamanho na escala sub-micron (<1000 nm, <1µm), tamanho tal expresso em nanômetros, por isso o hábito de chamá-las de “nano”. Exemplos destes sistemas são as nanopartículas poliméricas, nanoemulsão, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos e incluem as nanocápsulas e as nanoesferas. As nanocápsulas são vesículas formadas por uma parede polimérica que envolve um núcleo geralmente oleoso, sendo que o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo ou e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são

constituídas apenas de uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se retido dentro da matriz ou adsorvido na superfície da esfera (SCHAFFAZICK et al., 2003; RAO e GECKELER, 2011).

As nanopartículas lipídicas sólidas são compostas de lipídeos que são sólidos tanto na temperatura ambiente quanto no meio biológico. Elas apresentam algumas vantagens em relação aos lipídios líquidos, pois promovem uma liberação mais lenta do fármaco já que a mobilidade do fármaco na matriz sólida é relativamente menor, e desta forma promovem uma liberação controlada do fármaco (GESZKE-MORITZ e MORITZ, 2016).

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídica (geralmente, fosfatidilcolina). Fármacos lipofílicos podem ser incorporados na bicamada lipídica e ao contrário, fármacos hidrofílicos estão dissolvidos no interior do núcleo aquoso (MEHNERT e MADER, 2012a).

Figura 6 - Desenho representativo dos sistemas nanoestruturados. (a) nanolipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula; (f) nanoesfera. Imagem retirada de (POHLMANN et al., 2016).

As emulsões consistem em uma dispersão de dois líquidos imiscíveis entre si (geralmente água e óleo) estabilizados por um surfactante, podendo ser de dois tipos: óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O).

O termo microemulsão (ME) foi introduzido na literatura por Hoar e Schulman, em 1943, para descrever um sistema fluido e translúcido obtido espontaneamente pela mistura de óleo e água com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado a um

álcool de cadeia média. Observou-se através de microscopias eletrônicas que as dispersões formadas eram constituídas de microglóbulos de tamanhos variando entre 100 e 600 nm, ou seja, significativamente menores que as emulsões simples (HOAR e SCHULMAN, 1943).

O desenvolvimento de uma microemulsão geralmente envolve a mistura de três componentes principais: tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e quando necessário, a utilização de um co-tensoativo. A orientação e formação dos sistemas A/O ou O/A depende das propriedades físico-químicas do tensoativo escolhido e é determinado pelo seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo (EHL) (OLIVEIRA et al., 2004). O sistema pode produzir gotículas com tamanhos suficientemente pequenos, por isso, alguns autores também utilizam a denominação de “submicron emulsion” ou nanoemulsão.

Os tensoativos do tipo não iônicos, como por exemplo, os Spans e Tweens, são geralmente mais hidrofóbicos e tendem a produzir emulsões mais estáveis, pois são menos susceptíveis à precipitação na presença de meios com altas concentrações de íons. Além disso, apresentam a vantagem de serem menos tóxicos que a maioria dos surfactantes (TADROS, 2005).

As microemulsões, de forma geral, são sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes. Nas ME do tipo O/A, o fármaco pouco solúvel pode estar dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na interface óleo-água (SILVA et al., 2009).

Figura 7 – Estrutura das microemulsões água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A). Imagem adaptada de (OLIVEIRA et al., 2004).

1.7- As Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As Metaloproteinases de Matriz extracelular constituem uma família de endopeptidases com atividade proteolítica e cuja atividade é dependente de zinco. Elas diferem entre si estruturalmente e em sua habilidade de degradar grupos particulares de

proteínas da matriz extracelular (MEC). Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de MMPs humanas foram identificados e são classificadas em 7 grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e organização dos domínios: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, tipo-membrana (MT-MMPs), metaloelastases e outras (LAZARO et al., 2016).

Em geral, todas as MMPs são constituídas por uma estrutura básica que é formada por 3 domínios: sequência de sinal de peptídeos, prodomínio e domínio catalítico que contém o sítio ativo de Zn^{2+} . Além disso, a maioria delas possui o domínio de hemopexina, responsável pela interação com os substratos e que por isso confere especificidade a estas enzimas. A região de dobra também é comum e faz a conexão entre os domínios catalítico e de hemopexina (RICCI et al., 2016).

As MMP-2 e MMP-9, que são denominadas gelatinases devido a sua especificidade pelo colágeno desnaturado, contém um domínio de fibronectina repetido, que é responsável pela ligação ao substrato.

Figura 8 – Estrutura e classificação das Metaloproteinases de Matriz (MMPs). Imagem adaptada de (Löffek;Schilling;Franzke, 2011).

As MMPs foram inicialmente descobertas e descritas pela sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, laminina, fibronectina, elastina e proteoglicanos, entre outros. Mais recentemente, estudos demonstraram que elas são capazes também de clivar diversos tipos de peptídeos e proteínas e, além disso, desempenham inúmeras funções biológicas que não são consequência direta de sua atividade proteolítica.

A atividade catalítica das MMPs é controlada em diversos níveis através de mecanismos que envolvem a expressão gênica, ativação do zimogênio, compartimentalização e inibição da atividade enzimática pelos TIMPs (Inibidores Teciduais de Metaloproteinases) (ARPINO, BROCK e GILL, 2015). As MMPs são produzidas e secretadas como proenzimas em sua forma inativada (zimogênio), sendo ativadas através de mecanismos que causam a quebra do sítio de cisteína através da clivagem do prodomínio (autólise ou por outras proteínas). Além disso, o sítio de cisteína pode ser ativado através de reações químicas, na qual espécies reativas de oxigênio (EROs) causam a oxidação do prodomínio, seguido de clivagem autolítica (KLEIN e BISCHOFF, 2011; RA e PARKS, 2007; TOKITO e JOUGASAKI, 2016).

Nos últimos anos, têm-se estudado a participação das MMPs na regulação de diversos processos celulares. Através de suas propriedades proteolíticas, como por exemplo, clivagem de citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e proteínas de membranas, as MMPs podem desempenhar funções críticas nos processos de imunidade, reparação tecidual, diferenciação e transformação celular (APTE e PARKS, 2015; Löffek;Schilling;Franzke, 2011).

No processo de cicatrização de feridas, as MMPs estão presentes durante as três fases do processo (inflamação, reepitelização e formação da cicatriz), desempenhando funções regulatórias importantes (DE MEDEIROS et al., 2016; ROHANI e PARKS, 2015; GILL e PARKS, 2008). Na fase inflamatória, as MMPs modulam mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, ativando a resposta inflamatória e também estabelecem gradientes quimiotáticos que regulam a migração de leucócitos para o tecido injuriado (MANICONE e MCGUIRE, 2008). Na etapa denominada reepitelização, na qual ocorre o fechamento da ferida e a diferenciação celular, é necessário que as células epiteliais percam os sítios de contato célula-célula e célula-MEC e assumam características migratórias (MARTIN e NUNAN, 2015). Na fase final, ocorre a remodelação da matriz extracelular e contração da ferida, sendo que estes processos resultam da participação direta das MMPs na síntese e degradação contínua das fibrilas de colágeno (LINDLEY et al., 2016; GILL e PARKS, 2008).

V- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos de equivalentes dérmicos apresentam características interessantes como poder de contração e se assemelham morfológicamente ao tecido *in vivo*, podendo, portanto, ser utilizados para entender fenômenos biológicos como o processo de cicatrização e regeneração tecidual.

Nos modelos celulares tridimensionais, obtemos respostas mais semelhantes ao tecido *in vivo*, pois as interações celulares e célula-matriz são maiores, proporcionando um ambiente mais complexo. Por isso, o interesse no desenvolvimento de modelos alternativos que mimetizam a pele humana tem se tornado maior nos últimos anos, auxiliando nas etapas de desenvolvimento e testes de eficácia e segurança de fármacos e cosméticos.

O modelo celular tridimensional escolhido foi denominado de equivalentes dérmicos, pois se assemelham à derme humana, é formado pelo cultivo de fibroblastos em uma matriz de colágeno tipo I. Este modelo pode servir como um substituto cutâneo, funcionando como uma matriz para a migração e proliferação celular. Outras aplicações envolvem a utilização deste modelo como base para a co-cultura de outras linhagens celulares mimetizando sistemas mais complexos como a pele completa (derme + epiderme constituída de queratinócitos e/ou melanócitos) ou até mesmo linhagens de câncer, mimetizando um ambiente patológico.

Este trabalho permitiu o desenvolvimento de protocolos para a caracterização dos equivalentes dérmicos através de técnicas clássicas como a histologia, e por técnicas mais modernas, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal, nunca antes realizadas.

O desenvolvimento dos equivalentes dérmicos depende principalmente de dois fatores: quantidade de células e concentração de colágeno. Observamos que a concentração celular utilizada no preparo dos equivalentes dérmicos influencia diretamente na cinética de contração dos equivalentes dérmicos. Ou seja, quanto maior a concentração celular inicial, maior é a contração observada nos primeiros dias. Além disso, como os fibroblastos são os principais responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular (MEC), como por exemplo, o colágeno, a quantidade celular também está indiretamente relacionada à formação da rede de colágeno. A concentração de colágeno por outro lado, é indiretamente proporcional à cinética de contração dos discos e formação da rede tridimensional. Quanto maior a concentração inicial de colágeno utilizada, menor é a contração observada.

O movimento de contração da matriz de colágeno é realizado mecanicamente pelas células que se ligam às fibras de colágeno e por isso, a taxa de contração depende essencialmente da quantidade de células e da disposição destas fibras. Além disso, observamos que o perfil de contração cinético depende do tipo de linhagem celular utilizado. A linhagem de fibroblastos NIH/3T3 nos permitiu trabalhar em um período de tempo relativamente menor, pois esta linhagem possui rápida taxa de replicação celular, permitindo a produção grande quantidade de ED para os vários testes realizados. Esta é uma vantagem quando se pensa no escalonamento da técnica e no aumento da produção de equivalentes dérmicos.

A linhagem de células-tronco HBMS reproduziu bem o sistema, apresentando até contração mais acentuada e diâmetros menores nos experimentos realizados. Uma possibilidade é que devido à sua morfologia mais alongada, como demonstrada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura e confocal, a ação mecânica da força de contração foi mais bem desempenhada. O modelo desenvolvido com as células-tronco torna-se promissor visto suas inúmeras possibilidades de aplicação na área; nos estudos de diferenciação celular e na área de regeneração tecidual, como substitutos dos mais variados tecidos.

Outro fator extremamente importante é o tipo de colágeno utilizado. Optamos por extrair o colágeno tipo I das caudas de ratos *Wistar* por ser um protocolo simples e barato, além disso, é descrito e utilizado em vários artigos na literatura. Observamos que a extração realizada em ácido acético 0,5% apresentou melhores resultados e também concluímos que o ideal é trabalhar com soluções de colágeno mais concentradas para utilizar volumes menores durante o preparo dos equivalentes dérmicos.

Nos estudos de fotobioestimulação, analisamos os efeitos da aplicação de um fármaco fotossensibilizante (CIAIPc) e luz de baixa intensidade nos modelos de equivalentes dérmicos. Após alguns testes para avaliar a toxicidade da formulação nanoemulsão e também do fármaco livre, decidiu-se trabalhar com a concentração de 3 $\mu\text{mol/L}$ de CIAIPc/NE, a qual não apresentou citotoxicidade nos experimentos realizados.

Os processos desencadeados pela fotobioestimulação são complexos e dependem de diversos fatores intrínsecos à técnica, como por exemplo, concentração intracelular do fármaco fotossensibilizante e dose de energia adequadas e combinadas em uma janela temporal correta, determinando assim, a modulação da produção e liberação de fatores de crescimento e sinalizadores bioquímicos para a proliferação, migração celular e outros eventos biológicos. Assim, os resultados obtidos neste trabalho foram importantes para os avanços nos estudos dos fotoprocessos e melhor entendimento dos efeitos fotobiológicos no modelo celular tridimensional escolhido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEARNE, M. Introduction to cell-hydrogel mechanosensing, *Interface focus*, v. 4, p. 20130038, 2014.
- AHMED, H.; SAYED, H. Photo-stimulatory effect of low level energy laser irradiation on the progress of wound healing in mice, *Journal of American Science*, v. 8, p. 203-211, 2012.
- AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. P. Matrix Metalloproteinase-2 Is an Interstitial Collagenase Inhibitor-Free Enzyme Catalyzes the Cleavage of Collagen Fibrils and Soluble Native Type I Collagen Generating the Specific 3/4- and 1/4- Length Fragments, *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 5872-5876, 1995.
- ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells, *Lasers in medical science*, v. 27, p. 237-249, 2012.
- ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-State of the art review, v. 5, p. 19-28, 2008.
- APTE, S. S.; PARKS, W. C. Metalloproteinases: a parade of functions in matrix biology and an outlook for the future, *Matrix biology*, v. 44, p. 1-6, 2015.
- ARPINO, V.; BROCK, M.; GILL, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis, *Matrix biology*, v. 44, p. 247-254, 2015.
- ASSELINEAU, D.; PRUNIERAS, M. Reconstruction of simplified skin: control of fabrication, *British Journal of Dermatology*, v. 111, p. 219-222, 1984.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, p. 27-51, 2005.
- BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties, *Clinics in Dermatology*, v. 30, p. 257-262, 2012.
- BELL, E.; IVARSSON, B.; MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 76, p. 1274-1278, 1979.
- BELL, E.; SHER, S.; HULL, B.; MERRILL, C.; ROSEN, S.; CHAMSON, A.; ASSELINEAU, D.; DUBERTRET, L.; COULOMB, B.; LAPIERE, C.; NUSGENS, B.; NEVEUX, Y. The reconstitution of living skin, *J. Invest Dermatol.*, v. 81, p. 2s-10s, 1983.
- BENOV, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions, *Medical Principles and Practice*, v. 24(suppl 1), p. 14-28, 2015.
- BI, H.; JIN, Y. Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies, *Burns & Trauma*, v. 1, p. 63-72, 2013.

- BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf/10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42. Acesso em: janeiro/2018.
- BRASIL, 2014. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº17, 3 de julho de 2014**. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=51&data=04/07/2014>. Acesso em: janeiro/2018.
- BRASIL, 2014. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº18, de 24 de setembro de 2014**. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=9&data=25/09/2014>. Acesso em: janeiro/2018.
- BRASIL, 2016. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº31, 18 de agosto de 2016**. Disponível em: <http://www.renama.org.br/wp-content/uploads/2014/04/RN-31-2016.pdf>. Acesso em: janeiro/2018.
- BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1758, p. 2080-2095, 2006.
- BROHEM, C. A.; DA SILVA CARDEAL, L. B.; TIAGO, M.; SOENGAS, M. a. S.; DE MORAES BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Artificial skin in perspective: concepts and applications, *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 24, p. 35-50, 2011.
- BUSKERMOLLEN, J. K.; REIJNDERS, C. M.; SPIEKSTRA, S. W.; STEINBERG, T.; KLEVERLAAN, C. J.; FEILZER, A. J.; BAKKER, A. D.; GIBBS, S. Development of a Full-Thickness Human Gingiva Equivalent Constructed from Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts, *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 22, p. 781-791, 2016.
- BUTLER, M. F.; NG, Y.; PUDNEY, P. D. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 41, p. 3941-3953, 2003.
- CALIXTO, M. G.; BERNEGOSI, J. +.; DE FREITAS, M. L.; FONTANA, R. C.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, v. 21, 2016.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.*, v. 1, p. 279-293, 2004.
- CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 7, p. 40-46, 1997.

- DA SILVA, C. M.; SPINELLI, E.; RODRIGUES, S. V. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay, ***Food Chem.***, v. 173, p. 619-623, 2015.
- DAVIS, P.; TABOR, B. E. Kinetic study of the crosslinking of gelatin by formaldehyde and glyoxal, ***Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry***, v. 1, p. 799-815, 1963.
- DAWOOD, M. S.; SALMAN, S. D. Low level diode laser accelerates wound healing, ***Lasers in medical science***, v. 28, p. 941-945, 2013.
- DE MEDEIROS, M. L.; ARAÚJO-FILHO, I.; DA SILVA, E. n. M. N.; DE SOUSA QUEIROZ, W. S.; SOARES, C. D.; DE CARVALHO, M. G. F.; MACIEL, M. A. M. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair, ***Lasers in medical science***, p. 1-9, 2016.
- DEBELS, H.; HAMDI, M.; ABBERTON, K.; MORRISON, W. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options, ***Plastic and reconstructive surgery Global open***, v. 3, 2015a.
- DEBELS, H.; HAMDI, M.; ABBERTON, K.; MORRISON, W. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options, ***Plastic and Reconstructive Surgery Global Open***, v. 3, p. e284, 2015b.
- DEYHIMI, P.; KHADEMI, H.; BIRANG, R.; AKHOONDZADEH, M. Histological Evaluation of Wound Healing Process after Photodynamic Therapy of Rat Oral Mucosal Ulcer, ***Journal of Dentistry***, v. 17, p. 43, 2016.
- DOURADO, K. B. V.; JUNIOR, L. C. C.; DE PAULO, R. J. F.; GOMES, A. C. Ledterapia: uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual, ***Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde***, v. 15, 2015.
- ELSON, N.; FORAN, D. Low Level Laser Therapy in Modern Dentistry, ***Periodontics and Prosthodontics***, v. 1, 2015.
- FARFARA, D.; TUBY, H.; TRUDLER, D.; DORON-MANDEL, E.; MALTZ, L.; VASSAR, R. J.; FRENKEL, D.; ORON, U. Low-level laser therapy ameliorates disease progression in a mouse model of Alzheimer's disease, ***Journal of Molecular Neuroscience***, v. 55, p. 430-436, 2015.
- FARIA, P. E. P.; FELIPUCCI, D. N. B.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; SALATA, L. A. Effects of photodynamic process (PDP) in implant osseointegration: a histologic and histometric study in dogs, ***Clinical implant dentistry and related research***, v. 17, p. 879-890, 2015.
- FERREIRA DA SILVA, T.; BARRETTO PENNA, A. L. c. Chemical characteristics and functional properties of collagen, ***Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)***, v. 71, p. 530-539, 2012.

- FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O.; ISAAC, C.; TEIXEIRA NETO, N.; SANTOS, G. B. d. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação, *Rev Bras Cir Plást*, v. 26, p. 696-702, 2011.
- FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, v. 54, p. 659, 1991.
- GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, p. 1-9, 2008a.
- GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, p. 1-9, 2008b.
- GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: composition, properties and therapeutic strategies, *Materials Science and Engineering: C*, v. 68, p. 982-994, 2016.
- GILL, S. E.; PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing, *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 40, p. 1334-1347, 2008.
- HERRMANN, D.; CONWAY, J. R.; VENNIN, C.; MAGENAU, A.; HUGHES, W. E.; MORTON, J. P.; TIMPSON, P. Three-dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumour microenvironment, *Carcinogenesis*, v. 35, p. 1671-1679, 2014.
- HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle, *Nature*, v. 152, p. 102-103, 1943.
- HOFMAN, K.; HALL, B.; CLEAVER, H.; MARSHALL, S. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen, *Analytical biochemistry*, v. 417, p. 289-291, 2011.
- HOLMES, R. +.; KIRK, S.; TRONCI, G.; YANG, X.; WOOD, D. Influence of telopeptides on the structural and physical properties of polymeric and monomeric acid-soluble type I collagen, *Materials Science and Engineering: C*, v. 77, p. 823-827, 2017.
- HUGHES, O. B.; RAKOSI, A.; MACQUHAE, F.; HERSKOVITZ, I.; FOX, J. D.; KIRSNER, R. S. A Review of Cellular and Acellular Matrix Products: Indications, Techniques, and Outcomes, *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 138, p. 138S-147S, 2016.
- ISAAC, C.; DE LADEIRA, P. R. S.; DO RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica, *Revista de Medicina*, v. 89, p. 125-131, 2010.
- ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, p. 501-511, 2010.

- JAYASREE, R. S.; GUPTA, A. K.; RATHINAM, K.; MOHANAN, P. V.; MOHANTY, M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats, *Journal of biomaterials applications*, v. 15, p. 176-186, 2001.
- JESUS, P. d. C.; SAEKI, S. I.; TEDESCO, A. C. An ex vivo study of photobiostimulation in the treatment of skin pathologies, *Journal of biophotonics*, v. 9, p. 1189-1198, 2016a.
- JESUS, P. d. C.; SAEKI, S. I.; TEDESCO, A. C. An ex vivo study of photobiostimulation in the treatment of skin pathologies, *Journal of biophotonics* 2016b.
- JIANG, Z.; SHAO, J.; YANG, T.; WANG, J.; JIA, L. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 98-104, 2014.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin, *European journal of dermatology: EJD*, v. 12, p. 390-399, 2002.
- KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation, *Lasers Life Sci*, v. 2, p. 53-74, 1988.
- KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 10, p. 221-237, 2011.
- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases, *Amino Acids*, v. 41, p. 271-290, 2011.
- KNAGGS, H. The cell biology of the extracellular matrix by Elizabeth D Hay. pp 468. Plenum Press, New York. 1991. \$89: ISBN 0-306-43951-4, *Biochemical Education*, v. 20, p. 187, 1992.
- KOLAR, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study, *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, v. 73, p. 54-57, 1990.
- KULKARNI, S. A.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery, *Pharmaceutical research*, v. 30, p. 2512-2522, 2013.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, p. 1-18, 2010.
- KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 61, p. 205-209, 2010.
- LANGER, R.; VACANTI, J. Advances in tissue engineering, *Journal of Pediatric Surgery*, v. 51, p. 8-12, 2016.
- LAU, P.; BIDIN, N.; KRISHNAN, G.; ANAYBBALEG, S. M.; SUM, M. B. M.; BAKHTIAR, H.; NASSIR, Z.; HAMID, A. Photobiostimulation effect on diabetic

- wound at different power density of near infrared laser, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 151, p. 201-207, 2015.
- LAZARO, J. L.; IZZO, V.; MEAUME, S.; DAVIES, A. H.; LOBMANN, R.; UCCIOLI, L. Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence, *Journal of wound care*, v. 25, p. 277-287, 2016.
- LEE, H. y.; INSELMAN, A. L.; KANUNGO, J.; HANSEN, D. K. Alternative models in developmental toxicology, *Systems biology in reproductive medicine*, v. 58, p. 10-22, 2012.
- LINDLEY, L. E.; STOJADINOVIC, O.; PASTAR, I.; TOMIC-CANIC, M. Biology and Biomarkers for Wound Healing, *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 138, p. 18S-28S, 2016.
- LIU, T. C.-Y.; WU, D. F.; ZHU, L.; PENG, P.; LIU, L.; YANG, X. B. Microenvironment dependent photobiomodulation on function-specific signal transduction pathways, *International Journal of Photoenergy*, v. 2014, 2014.
- LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYKOV, M.; GROSSMAN, N. Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy, *Laser Therapy*, v. 7, p. 101-105, 1995.
- LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H.; SHAINBERG, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity, *Photomedicine and Laser Therapy*, v. 23, p. 3-9, 2005.
- MA, H.; LI, Y. x.; CHEN, H. l.; KANG, M. l.; LIU, T. C.-Y. Effects of low-intensity laser irradiation on wound healing in diabetic rats, *International Journal of Photoenergy*, v. 2012, 2012.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte1, *An Bras Dermatol* 2003.
- MANICONE, A. M.; MCGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 19, p. 34-41, 2008.
- MARIA DE FÁTIMA, G. S.; ANDRADE, Y. A. d. M. V.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização, *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 41, p. 259-264, 2008.
- MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing, *British Journal of Dermatology*, v. 173, p. 370-378, 2015.
- MARTINS, D. O.; SANTOS, F. M.; BRITTO, L. R.; LEMOS, J. B.; CHACUR, M. Neurochemical effects of photobiostimulation in the trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, v. 31, p. 147-152, 2017.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Advanced drug delivery reviews*, v. 47, p. 165-196, 2012a.

- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Advanced drug delivery reviews*, v. 47, p. 165-196, 2012b.
- MEHRABAN, N.; FREEMAN, S. H. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production, v. 8, 2015.
- MENDONÇA, R. J. d.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, p. 257-262, 2009.
- MENDOZA-GARCIA, J.; SEBASTIAN, A.; ALONSO-RASGADO, T.; BAYAT, A. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy, *Wound Repair and Regeneration*, v. 23, p. 685-702, 2015.
- NICHOLAS, M. N.; JESCHKE, M. G.; AMINI-NIK, S. Methodologies in creating skin substitutes, *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, p. 3453-3472, 2016.
- NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.; REZENDE, R. M.; SANTOS, E. C.; LEITE, J. P.; MATTA, S. L. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention, *International journal of experimental pathology*, v. 95, p. 138-146, 2014.
- NYAME, T. T.; CHIANG, H. A.; ORGILL, D. P. Clinical applications of skin substitutes, *Surgical Clinics*, v. 94, p. 839-850, 2014.
- OLIVEIRA, A. G. d.; SCARPA, M. V. n.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsions: Structure and application as drug delivery systems, *Quimica Nova*, v. 27, p. 131-138, 2004.
- PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies, *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, p. S-3, 2010.
- POHLMANN, M.; ROSSI, W. S.; BRENDLER, C. F.; TEIXEIRA, F. G.; JÚNIOR, W. K. FABRICAÇÃO DIGITAL PARA AUXILIAR NO ENSINO-APRENDIZADO DE ALUNOS COM DEFICIÊNCIA VISUAL: ESTUDO DE CASO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS, *Blucher Design Proceedings*, v. 2, p. 2389-2396, 2016.
- PRESCIMONE, T.; TOGNOTTI, D.; CASELLI, C.; CABIATI, M.; D'AMICO, A.; DEL RY, S.; GIANNESSI, D. Reappraisal of Quantitative Gel Zymography for Matrix Metalloproteinases, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 28, p. 374-380, 2014.
- PRIMO, F. L.; DA COSTA REIS, M. B.; PORCIONATTO, M. A.; TEDESCO, A. C. In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells, *Curr. Med. Chem.*, v. 18, p. 3376-3381, 2011.
- PRIMO, F. L.; DE PAULA, L. B.; DE SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Photobiostimulation on wound healing treatment by ClAlPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent, *Curr. Med. Chem.*, v. 19, p. 5157-5163, 2012.

- PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. Combining photobiology and nanobiotechnology: a step towards improving medical protocols based on advanced biological models, *Nanomedicine. (Lond)*, v. 8, p. 513-515, 2013.
- PRINDEZE, N. J.; MOFFATT, L. T.; SHUPP, J. W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions, *Experimental Biology and Medicine*, v. 237, p. 1241-1248, 2012.
- RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity, *Matrix biology*, v. 26, p. 587-596, 2007.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 887-913, 2011.
- REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues, *Clin. Biochem.*, v. 29, p. 225-229, 1996.
- RICCI, S.; DGÇÖESPOSITO, V.; FORMISANO, P.; DI CARLO, A. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, v. 54, p. 1281-1290, 2016.
- ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 96, p. 1-8, 2009.
- ROHANI, M. G.; PARKS, W. C. Matrix remodeling by MMPs during wound repair, *Matrix biology*, v. 44, p. 113-121, 2015.
- RUCKER, R. B.; MURRAY, J. Cross-linking amino acids in collagen and elastin, *Am J Clin Nutr*, v. 31, p. 1221-1236, 1978.
- SAHU, K.; SHARMA, M.; BANSAL, H.; DUBE, A.; GUPTA, P. K. Topical photodynamic treatment with poly-L-lysine-chlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds of mice, *Lasers in medical science*, v. 28, p. 465-471, 2013.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. d. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737* 2003.
- SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability, *Annual review of biochemistry*, v. 78, p. 929-958, 2009.
- SILVA, A. P.; NUNES, B. R.; DE OLIVEIRA, M. C.; KOESTER, L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 64, p. 32-35, 2009.
- SILVA, J. C.; LACAVA, Z. G. M.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, L. P.; NETO, L. F. M.; SAURO, E. E.; TEDESCO, A. C. Evaluation of the use of low level laser and

- photosensitizer drugs in healing, *Lasers in surgery and medicine*, v. 34, p. 451-457, 2004.
- SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos, *Química Nova*, v. 25, p. 801-807, 2002.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, *Mater. Sci. Eng C. Mater. Biol. Appl.*, v. 33, p. 1744-1752, 2013.
- SMALLEY, K. S.; LIONI, M.; NOMA, K.; HAASS, N. K.; HERLYN, M. In vitro three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery, *Expert. Opin. Drug Discov.*, v. 3, p. 1-10, 2008.
- SNOEK-VAN BEURDEN, P. A.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Biotechniques*, v. 38, p. 73-83, 2005.
- SPERANDIO, F. F.; SIMOES, A.; ARANHA, A. C. I. C. a.; CORRÊA, L.; ORSINI MACHADO DE SOUSA, S. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing, *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, p. 581-587, 2010.
- STOCKERT, J. C.; BLAZQUEZ-CASTRO, A.; CANETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochem.*, v. 114, p. 785-796, 2012.
- TADROS, T. F. Surfactants In Nano-Emulsions, *Applied Surfactants: Principles And Applications*, p. 285-308, 2005.
- TOKITO, A.; JOUGASAKI, M. Matrix Metalloproteinases in Non-Neoplastic Disorders, *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 1178, 2016.
- TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, p. 445-459, 2009.
- TURRIONI, A. P.; BASSO, F. G.; MONTORO, L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; SOUZA COSTA, C. A.; HEBLING, J. Transdental photobiostimulation of stem cells from human exfoliated primary teeth, *International endodontic journal*, v. 50, p. 549-559, 2017.
- VANDOOREN, J.; GEURTS, N.; MARTENS, E.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes, *Nat Meth*, v. 10, p. 211-220, 2013.
- VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin, *Surgery-Oxford International Edition*, v. 28, p. 469-472, 2010.

- VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin, *International journal of pharmaceutics*, v. 258, p. 141-151, 2003.
- WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier, *American journal of infection control*, v. 34, p. S98-S110, 2006.
- WONG, T.; MCGRATH, J. A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration, *British Journal of Dermatology*, v. 156, p. 1149-1155, 2007.
- YAMAUCHI, M.; SHIIBA, M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen, *Post-translational Modifications of Proteins: Tools for Functional Proteomics*, p. 95-108, 2008.