UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da toxicidade e eficácia de ingredientes de uso tópico
por métodos alternativos *in vitro*: culturas 2D, 3D e microfluídica de
órgãos-em-chip**

Renata Spagolla Napoleão Tavares

Ribeirão Preto
2020

Renata Spagolla Napoleão Tavares

Avaliação da toxicidade e eficácia de ingredientes de uso tópico por métodos alternativos *in vitro*: culturas 2D, 3D e microfluídica de órgãos-em-chip

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 27/05/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2020

TAVARES; R; S: N:	Avaliação da toxicidade e eficácia de ingredientes de uso tópico por métodos alternativos <i>in vitro</i>: culturas 2D, 3D e microfluídica de órgãos-em-chip	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUTORADO FCFRPUSP 2020
----------------------	---	---	-------------------------------

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.

Renata Spagolla Napoleão Tavares

Avaliação da toxicidade e eficácia de ingredientes de uso tópico por métodos alternativos *in vitro*: culturas 2D, 3D e microfluídica de órgãos-em-chip. Ribeirão Preto, 2020.
130 p.; 30cm.

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

Orientador: Gaspar, Lorena Rigo.

1. Métodos alternativos *in vitro* 2. Modelo de pele humana 3. Microfluídica 4. Irritação 5. Fototoxicidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata Spagolla Napoleão Tavares

“Avaliação da toxicidade e eficácia de ingredientes de uso tópico por métodos alternativos *in vitro*: culturas 2D, 3D e microfluídica de órgãos-em-chip”

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Doutor 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: _____

Dedico esse trabalho ao Camilo, meu companheiro de todas as horas, minha sorte grande. A minha mãe querida, Kátia e ao meu irmão querido, Marcos. A Lorena pelos anos dedicados a esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a professora Lorena por ter me apresentado o maravilhoso mundo dos métodos *in vitro* alternativos à experimentação animal. Após o mestrado, pude criar um projeto de doutorado desafiador e inovador graças a todo o seu interesse na área da eficácia e toxicidade dos ingredientes que utilizam a pele humana como sistema de teste. Sou grata por todas as oportunidades que criamos juntas para que este pudesse ser realizado. Agradeço também a técnica e amiga Karina, a Carolina e aos alunos do laboratório, em especial a amiga Camila.

Agradeço a professora Dra Monika Schäfer-Korting, por ter me recebido na *Freie Universität* e especialmente ao *post-doc* Dr Christian Zoschke. Adorei ter trabalhado com todos do grupo! Especialmente, obrigada a técnica Carola Kapfer, a coordenadora do programa BB3Rs Dra Vivian, aos alunos Bárbara, Christian, Christofer, Anna, Rawan, Anne, Patrik, e as amigas Bianca e Letícia.

Agradeço imensamente ao Dr. Uwe Marx e ao Professor Dr Roland Lauster pela incrível oportunidade de me receberem na *Spin-off TissUse GmbH*, também em Berlim. Em especial a amiga e *partner* de pesquisa Thi Phuong Tao, foi muito bom poder aprender e conviver com você! Agradeço também as queridas Dras Annika Winter, Ilka Maschmeyer, Beren Ataç, Daniel Fausto e Katharina Schimek pelo suporte durante o projeto; e a Alexandra Lorenz, Reyk Horland e Sarah pelas negociações da transferência de tecnologia. Pela ótima convivência, um agradecimento especial a Oussama, Corinna, Anne, Juliane, Christine, Isi, Sascha, Locke, Flora, Henrico e aos demais pesquisadores da empresa.

Pelas considerações e contribuições ao trabalho durante o Exame de Qualificação, gostaria de agradecer aos professores Renata Fonseca Vianna Lopez, Marlus Chorilli e Laena Pernomian.

Obrigada aos funcionários da pós-graduação da FCFRP, Rafael, Rosana e em especial a Eleni.

Agradeço também a minha querida família sempre orgulhosa, me dando o apoio necessário. No mais, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento de Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) e pela Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Presentemente eu posso me considerar um sujeito de sorte porque apesar de muito moço me sinto são e salvo e forte e tenho comigo pensado Deus é brasileiro e anda do meu lado e assim já não posso sofrer no ano passado”

(Sujeito de sorte – Belchior)

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas e siglas.....	x
Lista de símbolos.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1. Contextualização dos métodos <i>in vitro</i> alternativos à experimentação animal...	06
2.2. Ensaios em monocamadas - 2D.....	08
2.3. Ensaios em modelos 3D.....	10
2.4. Modelo de pele reconstituída e modelo de fígado.....	11
2.5. Ensaio irritação e fotoirritação cutâneas.....	12
2.6. Ensaios de organoides em microfluídica.....	13
2.7. Seleção das substâncias avaliadas.....	15
2.8. Coletânea de artigos.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. TRABALHOS DESENVOLVIDOS.....	19
4.1. Capítulo 1 – Avaliação de fotoestabilidade, potencial fotoprotetor e fototóxico da fucoxantina por métodos <i>in vitro</i> Artigo 1: TAVARES, R. S. N.; KAWAKAMI, C. M.; PEREIRA, K. C.; DO AMARAL, G. T. et al. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs. Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by <i>In vitro</i> Methods. <i>Antioxidants</i> , 9, n. 4, 2020.....	20
4.2. Capítulo 2 – Potencial de irritação cutânea da fucoxantina e sua influência na inflamação, homeostase e metabolismo da pele 3D Artigo 2: TAVARES, R. S. N.; MARIA-ENGLER, S. S.; COLEPICCOLO, P.; DEBONSI, H. M. et al. Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on	

Inflammation, Homeostasis, and Metabolism Pharmaceuticals, 136, p. 1-12, 2020.....	50
---	----

4.3. Capítulo 3 – Avaliação de toxicidade da terbinafina por via tópica e sistêmica em condição estática versus dinâmica (*organ-on-a-chip*)

Artigo 3: TAVARES, R. S. N.; TAO, T. P.; MASCHMEYER, I.; SCHÄFER-KORTING, M.; ZOSCHKE, C.; WINTER, A.; MARIA-ENGLER, S. S.; MARX, U.; GASPAR, L. R.1. Toxicity of Topically Applied Drugs Beyond Skin Irritation: Static Skin Model vs Two Organs-on-a-Chip, submitted to International Journal of Pharmaceutics.....	69
---	----

5. DISCUSSÃO.....	111
6. CONCLUSÃO.....	117
7. REFERÊNCIAS.....	120
ANEXOS.....	124

RESUMO

TAVARES; R. S. N. **Avaliação da toxicidade e eficácia de ingredientes de uso tópico por métodos alternativos *in vitro*: culturas 2D, 3D e micro fluídica (Organ-on-a-chip)**. 2020. 155f Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Os ensaios *in vitro* são aceitos como alternativos à experimentação animal, apenas se apresentarem alta reprodutibilidade e relevância para predizer a toxicidade em seres humanos. Assim, novas tecnologias, tais como tecidos tridimensionais (3D) foram desenvolvidas para preencher a lacuna entre os modelos *in vitro* bidimensionais (2D) e melhorar a correlação com os humanos. Mais recentemente, os sistemas microfluídicos órgãos-em-chip, que emulam a fisiologia do ambiente *in vivo* por permitirem a inclusão de diferentes organoides em um mesmo meio circulante, possuem maior potencial preditivo em relação à toxicidade humana e podem ser utilizadas durante a triagem de substâncias desconhecidas. O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver e comparar a capacidade de sistemas *in vitro* de diferentes complexidades: culturas 2D, pele 3D cultivada de modo estático ou em microfluídica associada ao modelo de fígado, em predizer a toxicidade e eficácia das substâncias teste. Para tal, foi desenvolvido um modelo de pele - *Reconstructed Human Skin* (RHS). Na primeira abordagem, o modelo RHS foi aplicado para a avaliação da fototoxicidade e da atividade antioxidante da fucoxantina, isolada de alga antártica e com um conhecido potencial antioxidante nunca testado na pele humana. A fucoxantina se mostrou fototóxica em monocamadas e fotoinstável, porém quando adicionada em fotoprotetor se mostrou fotoestável. A fucoxantina não foi considerada fototóxica em modelo de pele, demonstrando a importância da presença do estrato córneo para confirmar a toxicidade de compostos desconhecidos. Ainda, se mostrou capaz de inibir as espécies reativas do oxigênio (ERO) de maneira significativa tanto em monocamadas quanto em modelo de pele, mostrando que mesmo em baixas concentrações, exerce efeito protetor contra ERO gerados pela radiação UVA. A etapa seguinte, o RHS foi miniaturizado para adequação em sistema de órgãos-em-chip e o RHS reduzido foi utilizado no ensaio de irritação cutânea da fucoxantina (OECD TG 439). Novas análises foram incluídas em paralelo para a identificação de novos biomarcadores da irritação nos tecidos; o controle positivo lauril sulfato de sódio (LSS) foi considerado irritante e a fucoxantina não; entretanto, a fucoxantina reduziu a expressão de gênica de interleucinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) quando no veículo etanol, e aumentou a expressão de NAT1, indicando sua metabolização pela pele e efeito protetor aos efeitos deletérios do etanol. Na terceira abordagem, ensaio de irritação cutânea do RHS reduzido foi avaliado tanto em cultivo estático, quanto dinâmico, para tal, o fármaco de escolha foi o antifúngico terbinafina, por se acumular na pele humana e ter potencial hepatotóxico em terapias de longo prazo. No modelo dinâmico, o RHS foi associado a modelo de fígado e o sistema foi chamado de Chip2. Tanto no RHS estático quanto no Chip2 a terbinafina não foi considerada irritante enquanto que o controle positivo LSS foi o único considerado irritante, por meio dos resultados metabólicos, de liberação de IL-6 e ainda pela análise de viabilidade celular por LDH e MTT (nos tecidos estáticos). Demonstrou também efeitos deletérios nos esferoides de fígado, mostrando ter atravessado o modelo de RHS. Entretanto, no RHS a concentração tópica de terbinafina a 5% no Chip2 aumentou a expressão de IL-1 α e ainda aumentou células apoptóticas e diminuiu as proliferativas nos esferoides de fígado, aumentando também a expressão das enzimas hepáticas CYP1A2 e CYP3A4, o que prova que também atravessou o RHS para exercer os efeitos

observados no fígado. A aplicação sistêmica de 0,1% de terbinafina aumentou a expressão de EGFR apenas no RHS do Chip2 e aumentou as células apoptóticas no fígado, além de regular negativamente a albumina e regular positivamente CYP2C9, agindo como um controle hepatotóxico de terbinafina. A combinação de RHS e fígado no Chip2 em microfluídica permitiu uma resposta mais sensível do RHS observado apenas pela expressão gênica e permitiu a avaliação de efeitos hepáticos causados pelas substâncias capazes de atravessar o RHS. Em conclusão, o aumento da complexidade dos ensaios *in vitro* desenvolvidos no presente trabalho abrem novas perspectivas para a avaliação da toxicidade e da eficácia de substâncias teste, com o potencial para melhorar a predição dos estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Métodos alternativos *in vitro*, modelo de pele humana, microfluídica, esferoide de fígado, órgãos em chip, irritação, citotoxicidade, fototoxicidade.

ABSTRACT

TAVARES; R. S. N. **Toxicity assessment of topical ingredients by *in vitro* alternative methods: 2D, 3D and microfluidic (Organ-on-a-chip) cultures.** 2020. 155f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

In vitro tests are accepted as alternatives to animal experimentation, only if they have high reproducibility and relevance for predicting toxicity in humans. Thus, new technologies such as three-dimensional (3D) reconstructed tissues have been developed to fill the gap between two-dimensional (2D) *in vitro* models and improve the correlation with humans. More recently, microfluidic organ-on-a-chip systems, which emulate the physiology of the *in vivo* environment by allowing the inclusion of different organoids in the same circulating medium, have greater predictive potential for human toxicity and can be used during the screening of unknown substances. The objective of this study was to develop and compare the capacity of *in vitro* systems of different complexities: 2D cultures, 3D skin cultivated in a static way or in microfluidic associated to a liver model, to predict the toxicity and efficacy of the test substances, following established protocols and internationally recommended. To this end, a reconstructed human skin (RHS) was developed. In the first approach, the RHS model was applied for the evaluation of phototoxicity and antioxidant activity of fucoxanthin, isolated from Antarctic algae, with promising antioxidant activity never tested in the human skin. Fucoxanthin was shown to be phototoxic in the monolayer assay and photo unstable, but when added in a sunscreen it was shown to be photostable. Fucoxanthin was not considered phototoxic in the RHS, demonstrating the importance of the stratum corneum to confirm the toxicity of unknown compounds. It was also shown to inhibit reactive oxygen species (ROS) significantly in both monolayers and RHS, demonstrating that even at low concentrations it exerts a protective effect against ROS generated by UVA radiation. The next step, RHS was miniaturized for adaptation in an organ-chip system and the reduced RHS was used in the fucoxanthin skin irritation test (OECD TG 439). New analyses were included in parallel for the identification of new biomarkers of tissue irritation; the positive control of sodium lauryl sulfate (LSS) was considered irritant and fucoxanthin was not; however, fucoxanthin reduced the gene expression of pro-inflammatory interleukins (IL-6 and IL-8) when in the ethanol vehicle, and increased the expression of NAT1, indicating its metabolism by the skin and protective effect to the deleterious effects of ethanol. In the third approach, the reduced RHS skin irritation test was evaluated both in static and dynamic culture, for which the drug of choice was the antifungal terbinafine, as it accumulates in human skin and has hepatotoxic potential in long-term therapies. In the dynamic model, RHS was associated with the liver model and the system was called Chip2. In both static RHS and Chip2, terbinafine was not considered irritant, while the LSS positive control was the only one considered irritant, through metabolic results, IL-6 release and also through cell viability analysis by LDH and MTT (in static tissues). It also demonstrated deleterious effects on liver spheroids, showing to have passed through the RHS model. However, in RHS the topical concentration of 5% terbinafine in Chip2 increased IL-1 α expression; in liver spheroids it increased apoptotic cells and decreased proliferative cells, and also increased CYP1A2 and CYP3A4 enzyme expression, proving that it also passed through RHS to exert the effects observed in the liver. The systemic application of terbinafine of 0.1% increased EGFR expression only in the RHS of Chip2 and increased the apoptotic cells in the liver, in addition to

regulating albumin negatively and regulating CYP2C9 positively, acting as a hepatotoxic control of terbinafine. The combination of RHS and liver on Chip2 in microfluidics allowed a more sensitive response of RHS observed only by gene expression and allowed the evaluation of liver effects caused by substances capable of passing through RHS. In conclusion, the increased complexity of the in vitro tests developed in this work opens new perspectives for the evaluation of the toxicity and efficacy of test substances, with the potential to improve the prediction of preclinical studies.

Keywords: Alternative methods, in vitro, human skin model, microfluidics, liver spheroid, two organs-on-a-chip, irritation, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Esquema sobre o desenvolvimento dos trabalhos da tese que avaliam a fucoxantina e a terbinafina versus o controle de cada ensaio. Observa-se a complexidade biológica crescente dos ensaios diretamente proporcional ao aumento da relevância para o desenvolvimento de novos fármacos. Adaptado de Mathes et al., 2014..... 17

4.1 CAPÍTULO 1 – Avaliação de fotoestabilidade, potencial fotoprotetor e fototóxico da fucoxantina por métodos *in vitro*

Artigo 1: TAVARES, R. S. N.; KAWAKAMI, C. M.; PEREIRA, K. C.; DO AMARAL, G. T. et al. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs. Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by *In vitro* Methods. *Antioxidants*, 9, n. 4, 2020..... 31

Figure 1. Absorption spectra of (a) The alga *D. anceps* crude extract; isopropanol solution, 100 µg/ mL; (b) The fractions obtained from this crude extract presented different spectrum profiles; F = fraction, numbers ordered by elution (nonpolar to polar “a” indicates the second day of the extraction. Representative curves from triplicates.....

Figure 2. Photostability studies based on the electromagnetic spectrum of the samples irradiated (yellow line) or not (blue line). (a) *D. anceps* extract in solution irradiated or not with 27.5 J/cm². (b) Fr15 fraction containing fucoxanthin in solution irradiated or not with 27.5 J/cm². (c) Fucoxanthin (Fx) in solution irradiated or not with 6 J/cm². (d) Fx in a sunscreen formulation vs. sunscreen alone (dashed line) irradiated or not with 27.5 J/cm²; n = 3, three independent experiments..... 35

Figure 3. Phototoxicity assay using in-house Reconstructed human skin (RHS)—MTT assay, the positive control 3% ketoprofen was phototoxic ($\Delta >$ cut-off 30%) and 0.5% fucoxanthin was non-phototoxic (cell viability ~ 99%) when irradiated (yellow bar) or not (blue bar), mean $\pm$ SD, n = 2 in two independent experiments..... 37

Figure 4. Intracellular Reactive Oxygen Species generation in HaCat after UVA irradiation (4 J/cm²) using a fluorescent probe DCFH₂-DA; untreated irradiated (+UV) and non-irradiated (–UV); norfloxacin—Nor (control); quercetin—Quer (control); fucoxanthin—Fx. Where “*” means significantly different from untreated control irradiated (+UV) (p < 0.001) and “***” significantly different from fucoxanthin at 0.1, 1, and 10 µg/mL (p < 0.001). Mean $\pm$ SD, n = 3 in three independent experiments..... 39

Figure 5. Reconstructed human skin after UVA irradiation (10 J/cm²) using a fluorescent probe DCFH₂-DA. Reactive Oxygen Species generation quantified by the fluorescent intensity in pixels/area. Untreated (blue bar non-irradiated and yellow bars irradiated); sunscreen and sunscreen plus 0.5% fucoxanthin (Fx). Where “*” means significantly different from untreated irradiated (+UV) and from

sunscreen treated models ($p < 0.001$). Mean $\pm$ SD, $n = 3$ in three independent experiments..... 40

Figure 6. Representative reconstructed human skin (RHS) sessions (10 μm) exposed to a fluorescent probe DCFH2-DA and submitted or not to UVA irradiation (10 J/cm²)—(a) untreated non-irradiated; (b) untreated irradiated; (c) sunscreen irradiated; and, (d) sunscreen plus 0.5% fucoxanthin irradiated. Green fluorescent intensity represents the Reactive Oxygen Species (ROS) generation in the tissues. Scale bars = 100 μm , $n = 3$; three independent experiments..... 40

4.2 CAPÍTULO 2 – Potencial de irritação cutânea da fucoxantina e sua influência na inflamação, homeostase e metabolismo da pele 3D

Artigo 2: TAVARES, R. S. N.; MARIA-ENGLER, S. S.; COLEPICCOLO, P.; DEBONSI, H. M. et al. Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism Pharmaceutics, 136, p. 1-12, 2020.

Figure 1. Morphology and protein expression in reconstructed human skin. (a) Hematoxylin-eosin staining showing all layers of human skin. (b) Immunolocalization of keratin-10 (green) in suprabasal epidermal layers and keratin-14 (red) in all epidermal layers. (c) Immunolocalization of involucrin (green), indicating terminal keratinocyte differentiation. Images are representative of three batches; nuclei in blue (DAPI); scale bars = 100 μm 56

Figure 2. Morphology and protein expression in reconstructed human skin following fucoxanthin exposure versus the vehicles alone. (a–c) Hematoxylin-eosin staining with slightly disturbed morphology in c. (d–f) Immunolocalization of filaggrin with enhanced expression in d and f. (g–i) Similar immunolocalization of involucrin in all samples. Images are representative of at least three batches; nuclei in blue (DAPI); scale bars = 100 μm 57

Figure 3. Fucoxanthin effects on the viability of reconstructed human skin. Test substances below the 50% threshold (dashed line) are predicted to be skin irritant. PBS—phosphate buffered saline (negative control); SDS—sodium dodecyl sulfate (positive control); Fx—fucoxanthin. Alkyl benzoate and ethanol were exposed for 15 min to the RHS and subsequently washed off. Mean + SD, $n \geq 3$, $*p \leq 0.05$ compared to SDS..... 58

Figure 4. Fucoxanthin effects on the gene expression of reconstructed human skin. Fold change in gene expression was calculated in relation to the gene expression in reconstructed human skin exposed to the respective solvent (dashed line), SDS to PBS and Fx to alkyl benzoate or to ethanol. SDS—sodium dodecyl sulfate; PBS—phosphate-buffered saline; Fx—fucoxanthin; IL—interleukin; EGFR—epidermal growth factor receptor; HSPB1—small heat and shock protein beta 1; NAT1—N-acetyltransferase 1. Mean + SD, $n = 3$ 59

4.3 CAPÍTULO 3 – Avaliação de toxicidade da terbinafina por via tópica e sistêmica em condição estática versus dinâmica (organ-on-a-chip)

Artigo 3: TAVARES, R. S. N.; TAO, T. P.; MASCHMEYER, I.; SCHÄFER-KORTING, M.; ZOSCHKE, C.; WINTER, A.; MARIA-ENGLER, S. S.; MARX, U.; GASPAR, L. R.1. Toxicity of Topically Applied Drugs Beyond Skin Irritation: Static Skin Model vs Two Organs-on-a-Chip, submitted to Int J Pharmaceutics.

Figure 1. Cross-section of the HUMIMIC Chip2. The liver (cyan, left) and RHS (brown, right) are connected by a microfluidic tube system (magenta). The peristaltic three-valve micropump (black, rear) ensures the medium exchange between liver and RHS on-chip. The test compounds were either applied topically to the RHS or systemic into the microfluidic tube system. Reprinted and modified, with permission, from (Hübner et al., 2018)..... 75

Figure 2. Skin morphology. HE staining of (a) RHS in static culture and (b) RHS on-chip. Immunolocalization of keratin-14 (KRT14, red) and keratin-10 (KRT10, green) (c) RHS in static culture and (d) RHS on-chip. Images were representative of three batches, scale bar = 100 μm 85

Figure 3. Effects on skin cell proliferation and apoptosis. Immunolocalization of proliferative (Ki-67, red) and apoptotic (TUNEL, green) following the topical application on RHS of SDS 5%, EtOH, Terbinafina 1%, Terbinafina 5% and following systemic application of EtOH and terbinafina 0.1%. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Images were representative of three batches, scale bar = 100 μm 86

Figure 4. Effects on liver cell proliferation and apoptosis. Immunolocalization of proliferative (Ki-67, red) and apoptotic (TUNEL, green) at day 3 following the topical application on RHS of SDS 5%, EtOH, terbinafina 1%, terbinafina 5% and following systemic application of EtOH and terbinafina 0.1%. Sections of untreated liver on-chip models on day 0 and day 3 for comparison. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Images were representative of three batches, scale bar = 100 μm 88

Figure 5. Substance effects on the viability of RHS static. Test substances below the 50% threshold (dotted line) are predicted to be skin irritant. PBS - phosphate-buffered saline (negative control); SDS - sodium dodecyl sulfate (positive control); Terb - terbinafina were exposed for 15 min to the RHS and subsequently washed. Where solvent was applied, PBS or ethanol, the symbol was stated as “—”. Mean $\pm$ SD, n = 3, *p $\leq$ 0.05 compared to Terb 5%, +p $\leq$ 0.05 compared to all other treatments..... 89

Figure 6. Substance effects on the lactate dehydrogenase (LDH) release. Amount of LDH released from RHS (grey bar) or HUMIMIC (white bar) to the culture medium 42 h post-treatment. Where solvent was applied, PBS or ethanol, the symbol was stated as “—”. Values were normalized per volume culture medium and cell number per model. Triton was used as positive control and LDH release set to 100%; LDH release at 50% (dotted line). Mean $\pm$ SD, n = 9, *p $\leq$ 0.05..... 91

- Figure 7.** Substance effects on the lactate release. Amount of lactate released from RHS (grey bar) or HUMIMIC (white bar) to the culture medium 42 h post-treatment. Where solvent was applied, PBS or ethanol, the symbol was stated as “—”. Values were normalized per volume culture medium and cell number per model. Mean $\pm$ SD, n = 3, *p $\leq$ 0.05 between the same treatment, +p $\leq$ 0.05 compared to all other treatments..... 92
- Figure 8.** Substance effects on albumin production. Albumin produced by liver on-chip before and after treatment (day 1, white bar; day 3, dotted pattern bar,). Mean $\pm$ SD, n = 3..... 93
- Figure 9.** Substance effects on interleukine-6 (IL-6) release. Amount of IL-6 released from RHS to the culture medium 42 h post-treatment in static (grey bar) and on-chip (white bar) culture. Values were normalized per volume culture medium and cell number per model. Mean $\pm$ SD, n = 3..... 94
- Figure 10.** Substance effects on epidermal gene expression. Epidermal expression of (a) IL-1 α , (b) IL-6, (c) IL-8, (d) EGFR; expressed as fold change to the ethanol solvent control topical (dotted line). Mean $\pm$ SD; n = 3..... 96
- Figure 11.** Substance effects on hepatic gene expression. Hepatic expression of (a) CYP 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 (b) albumin and (c) IL-6 and IL-8 expressed as fold change to the ethanol solvent control topical (dotted line). Mean $\pm$ SD; n=3..... 97

LISTA DE TABELAS

4.1 CAPÍTULO 1 – Avaliação de fotoestabilidade, potencial fotoprotetor e fototóxico da fucoxantina por métodos *in vitro*

Artigo 1: TAVARES, R. S. N.; KAWAKAMI, C. M.; PEREIRA, K. C.; DO AMARAL, G. T. et al. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs. Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by *In vitro* Methods. **Antioxidants**, 9, n. 4, 2020.

Table 1 - Nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon (NMR ¹H and ¹³C) of fucoxanthin (500 and 125 MHz, CDCl₃) in comparison with literature data (400 and 67.5 MHz, CDCl₃)..... 33

Table 2 - Reduction of absorbance after irradiation with different doses of UVA light expressed in percentage. Calculation considering the Area Under the Curve (AUC) between samples irradiated or not in triplicates..... 35

Table 3 - Data from the 3T3 fibroblasts phototoxicity assay of the promising alga fractions, pure fucoxanthin, and the positive control (norfloxacin). 36

4.2 CAPÍTULO 2 – Potencial de irritação cutânea da fucoxantina e sua influência na inflamação, homeostase e metabolismo da pele 3D

Artigo 2: TAVARES, R. S. N.; MARIA-ENGLER, S. S.; COLEPICCOLO, P.; DEBONSI, H. M. et al. Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism *Pharmaceutics*, 136, p. 1-12, 2020.

Table 1 - Primer sequences for PCR studies..... 55

4.3 CAPÍTULO 3 – Avaliação de toxicidade da terbinafina por via tópica e sistêmica em condição estática versus dinâmica (organ-on-a-chip)

Artigo 3: TAVARES, R. S. N.; TAO, T. P.; MASCHMEYER, I.; SCHÄFER-KORTING, M.; ZOSCHKE, C.; WINTER, A.; MARIA-ENGLER, S. S.; MARX, U.; GASPAR, L. R.1. Toxicity of Topically Applied Drugs Beyond Skin Irritation: Static Skin Model vs Two Organs-on-a-Chip, submitted to *Int J Pharmaceutics*.

Table 1. Genes and respective sequences. Genes with asterisks were used as housekeeping genes..... 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3 NRU PT	3T3 <i>Neutral Red Uptake</i> - i.e. teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLV	Cromatografia Líquida à Vacuo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAD	Detector de Arranjos de Diodos
-dd	Duplo duplete
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECVAM	<i>European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing</i>
ERO	Espécies reativas do oxigênio
ESI	Ionização por “ <i>Electrospray</i> ”
Fx	Fucoxantina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	<i>International Council for Harmonization</i>
MeOH	Metanol
MHz	<i>Megahertz</i>
Min	Minutos
MPE	<i>Mean photo effect</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced</i>
OECD	<i>Organization for economic co-operation and development</i>
PIF	<i>Photo irritation fator</i>
RHS	<i>Reconstructed Human Skin</i>
RMN ¹³ C	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Treze</i>
RMN ¹ H	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Terb	Terbinafina
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
™	Trademark
®	Marca Registrada
©	Copyright
°C	Graus Celsius
$\mu\text{g/ mL}$	Microgramas por mililitro
μL	Microlitro
<i>cis</i>	Isômero <i>cis</i>
g	Grama
H1	Hidrogênio
J	Joule
mL	Mililitro
<i>trans</i>	Isômero <i>trans</i>
W	Watts
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
nm	Nanômetros
s	<i>Singleto</i>
t	<i>Tripleto</i>
-m	Multiplete
-Me	Metila
-d	<i>Dupleto</i>
eq	Posição equatorial

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, seguindo o processo de redução da experimentação animal criado pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), em 2014, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) publicou duas Resoluções Normativas (RN) nº 17, 18 (03 de julho, 24 de setembro de 2014, respectivamente) que estabeleceram o prazo de cinco anos (até 2019) para a proibição do uso de animais para 17 desfechos cujos métodos alternativos para substituição do modelo animal foram validados por centros de validação e reconhecidos e publicados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). No ano seguinte, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheceu os métodos pela resolução da diretoria colegiada nº35 (de 10 de agosto de 2015). Em 2021, será o prazo máximo para a substituição de mais sete métodos alternativos citados da RN nº 31 de 18 de agosto de 2016.

Este fato se deu após uma série de acontecimentos históricos iniciados pela mobilização internacional para a substituição de animais de experimentação em pesquisa na União Europeia em 1991 e estendeu-se para outros países. Desde então, muitos avanços têm sido observados nessa área, o que culminou no desenvolvimento e aceitação, pela OECD, de diferentes métodos para a redução e substituição dos ensaios em animais para a avaliação da segurança de compostos, uma vez que estes ensaios alternativos apresentam alta relevância e reprodutibilidade (HARTUNG, 2018). Em 2010, foi publicada a Diretiva Europeia (2010/63/UE) relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos, para cumprir a prioridade dos testes não-animais para todos os desfechos previstos na legislação da União Europeia.

Entretanto, no Brasil, para os testes que dependem de tecidos humanos reconstituídos, ainda é inadequada a burocracia envolvida na importação de tecidos comerciais ou insumos necessários para a sua produção no país. Esta questão vem sendo discutida junto à ANVISA para que a comercialização ou importação dos modelos oriundos de engenharia tecidual, como os modelos de pele, seja facilitada. Assim, protocolos internos (*in house*) de confecção desses tecidos são necessários e têm sido desenvolvidos por alguns grupos de pesquisa, mas os mesmos precisam ser validados para o uso pretendido (DE VECCHI et al., 2018; TAVARES et al., 2020).

Os sistemas de cultivo desses tecidos reconstituídos tridimensionais (3D) surgem como uma ponte para preencher a lacuna entre os modelos *in vitro* bidimensionais (2D) ou em monocamadas, e os modelos *in vivo*; ao exemplo do modelo de epiderme humana reconstituída, produzida a partir da proliferação e diferenciação de

queratinócitos humanos, que é reconhecida pela OECD para a avaliação dos desfechos de corrosão (TG 431, OECD, 2014) e irritação cutâneas (TG 439 OECD, 2015) em substituição ao modelo animal (DE VECCHI et al., 2018).

Avançando cada vez mais nas tecnologias de ponta disponíveis atualmente, os modelos 3D *in vitro* também apresentam limitações uma vez que os ensaios atuais são baseados em sua maioria em culturas estáticas (ATAÇ et al., 2013), os quais não conseguem mimetizar os arranjos complexos dos diferentes órgãos do corpo humano e suas funções (HASENBERG et al., 2015). Para isso, os modelos em chip, que são ferramentas planejadas fluidas e complexas, possuem o potencial de acelerar ainda mais a tradução de descobertas básicas em novas estratégias de tratamento mais efetivas, visto que essas propriedades de simular a fisiologia são cruciais para testes de toxicidade durante a triagem de substâncias desconhecidas (ATAÇ et al., 2013).

Os chips com múltiplos “órgãos” oferecem a oportunidade de estudar como uma substância afeta um modelo *in vitro* interconectado e perfundido, acrescido da influência de função hepática na avaliação da substância (TAVARES et al., 2020). Por esse motivo, dentre os vários órgãos, a serem associados a uma pele 3D, o fígado é o mais adequado para aplicações micro tecnológicas, visto que este possui uma microarquitetura extremamente complexa que é controlado por um preciso microambiente com interações micrométricas (YOON NO et al., 2015). Além disso, o fígado é o responsável pelo processo de desintoxicação, metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, assim como a biotransformação de substâncias endógenas e exógenas (ALÉPÉE et al., 2014; YOON NO et al., 2015).

Na presente tese, desenvolvemos um rápido protocolo de pele humana reconstituída (*Reconstructed Human Skin – RHS*) cultivado em 10 dias totalmente compatível com as plataformas de órgãos-em-chip (*organ-on-a-chip*). Utilizamos dois dos guias publicados pela OECD e reconhecidos pelo CONCEA e pela ANVISA, o de fototoxicidade em monocamadas, 2D (OECD TG 432) e o de irritação em modelo de pele 3D (OECD TG 439), bem como o ensaio de fotoirritação em modelo de pele 3D recomendado pelo Conselho Internacional de Harmonização (*International Council for Harmonization – ICH*) e pré-validado pela *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) (ICH, 2013).

Ainda, para os ensaios de irritação no modelo de pele, com o objetivo de obter uma visão mais detalhada sobre a toxicidade cutânea da substância teste, avaliamos a viabilidade dos tecidos de acordo com as diretrizes de ensaio da OECD nº 439 bem

como avaliação de padrões morfofisiológicos, alterações na inflamação (IL-1, IL-6, IL-8), homeostase (EGFR, HSPB1) e metabolismo (NAT1).

Para a avaliação da irritação cutânea no chip, seguimos o mesmo modelo de estudo, realizando análises além-viabilidade por MTT, tais quais as já citadas para o modelo de pele bem como as específicas ao fígado, como genes de metabolismo (CYPs), de homeostase (albumina) e perfil metabólico, para sugerir novos biomarcadores de detecção do processo de irritação e toxicidades inerentes, bem como para ampliar as informações acerca do ensaio validado.

6. CONCLUSÃO

A fucoxantina foi isolada da alga *D. anceps* e identificada como all-*trans*-fucoxantina; nos estudos de fotoestabilidade ela foi considerada fotoinstável, mas quando veiculada em filtro solar, a formulação foi considerada fotoestável não reduzindo em mais de 20% a degradação após a irradiação e ainda aumentou em 72% a absortividade da formulação demonstrando efeito UV-*booster*.

A fucoxantina foi considerada fototóxica no ensaio em monocamadas e este resultado não se confirmou no ensaio em pele 3D na concentração de 0,5%, o que era esperado uma vez que este tipo de ensaio apresenta limitações tais como a superestimação dos resultados de toxicidade devido ausência do estrato córneo como barreira de permeação cutânea, o que aumenta muito a sua biodisponibilidade frente a condições reais de uso; quanto a atividade antioxidante, tanto no ensaio e monocamadas quanto em modelo de pele 3D, foi observada uma inibição significativa na produção de ERO induzidas pelo UVA, demonstrando propriedades fotoprotetoras que deverão ser melhor investigadas nos ensaios clínicos.

O modelo de pele humana reconstituída produzida *in house*, foi miniaturizada com sucesso, manteve as excelentes características morfofisiológicas emulando a pele humana;

O modelo miniaturizado foi adequado para prever o potencial irritação e fototoxicidade dos controles positivos, negativos, das substâncias teste fucoxantina e da terbinafina; o modelo também considerado adequado para o cultivo em chip microfluídico de dois compartimentos.

Os biomarcadores IL1- α , IL-6, IL-8, EGFR e NAT1 utilizados no estudo de irritação cutânea contribuíram para confirmação da ausência de potencial irritante da fucoxantina; demonstrou também efeito anti-inflamatório da fucoxantina em relação aos efeitos deletérios do etanol nos tecidos (reduziu a expressão de gênica de IL-6 e IL-8) e superior biodisponibilidade quando neste veículo (aumento na expressão de NAT1), efeitos não observados para a fucoxantina em alquil benzoato.

O ensaio de irritação cutânea pôde ser realizado tanto em uma condição estática quanto dinâmica em chip microfluídico (Chip2).

Em ambos os ensaios de irritação (estático versus Chip2), a terbinafina não foi considerada irritante por meio dos resultados metabólicos, de liberação de IL-6 e ainda pela análise de viabilidade celular por LDH e MTT (nos tecidos estáticos), o controle positivo LSS foi considerado irritante e no cultivo no Chip2, o LSS demonstrou também efeitos deletérios nos esferoides de fígado, demonstrando ter atravessado o RHS. No

entanto, a terbinafina tópica a 5% aumentou a expressão de IL-1 α no RHS apenas do cultivo no Chip2 e aumentou a expressão das enzimas hepáticas CYP1A2 e CYP3A4, modificou a proporção de células proliferativas/apoptóticas nos esferoides, demonstrando ter permeado o RHS. Já a aplicação sistêmica de 0,1% de terbinafina aumentou a expressão de EGFR apenas no RHS do Chip2 e aumentou as células apoptóticas no fígado, além de regular negativamente o gene hepáticos de albumina e positivamente a enzima CYP2C9, agindo como um controle hepatotóxico de terbinafina. A combinação de RHS e fígado no Chip2 em microfluídica permitiu uma resposta mais sensível do RHS observada pela expressão gênica. O cultivo no Chip2 permitiu também a avaliação de efeitos hepáticos causados pelas substâncias capazes de atravessar o RHS.

Em geral e nas condições aplicadas, o aumento da complexidade dos ensaios *in vitro* ampliaram as análises de toxicidade e eficácia das substâncias corroborando com a hipótese de que quanto mais complexos e semelhantes ao microambiente nativo os sistemas *in vitro* forem, maior será a relevância para predizer a toxicidade em seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

ALÉPÉE, N.; BAHINSKI, A.; DANESHIAN, M.; DE WEVER, B. *et al.* State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology. **ALTEX**, 31, n. 4, p. 441-477, 2014.

ANTONI, D.; BURCKEL, H.; JOSSET, E.; NOEL, G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. **Int J Mol Sci**, 16, n. 3, p. 5517-5527, Mar 2015.

ATAÇ, B.; WAGNER, I.; HORLAND, R.; LAUSTER, R. *et al.* Skin and hair on-a-chip: *in vitro* skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. **Lab Chip**, 13, n. 18, p. 3555-3561, Sep 2013.

BALLS, M. The History of Alternative Test Methods in Toxicology. *In*: BALLS, M.; ROBERT, *et al* (Ed.). 2018. cap. 1.1, p. 2-6.

BRASIL. **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**. Brasília, DF.

CANAVEZ, A. D. P. M.; SILVEIRA, T. M. T. P.; VITA, N. D. A.; WEIHERMANN, A. C. *et al.* Integrated Safety Strategy for the Development of Children's Cosmetic Products Using *In vitro* and Clinical Methodologies *In*: ESKES, C.; MAIBACH, H. I., *et al* (Ed.). **Alternatives for Dermal Toxicity Testing**. Switzerland, 2017. cap. 41, p. 565-576.

CERIDONO, M.; TELLNER, P.; BAUER, D.; BARROSO, J. *et al.* The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity testing--the report of an ECVAM-EFPIA workshop. **Regul Toxicol Pharmacol**, 63, n. 3, p. 480-488, Aug 2012.

CURREN, R. D.; ESKES, C.; CHENG, S.; H., H. E. Contributions to the Development of Alternatives in Toxicology in China and Brazil. *In*: BALLS, M.; COMBES, R., *et al* (Ed.). **The History of Alternative Test Methods in Toxicology**. Switzerland, 2018. cap. 2.9, p. 87-94.

D'ORAZIO, N.; GEMELLO, E.; GAMMONE, M. A.; DE GIROLAMO, M. *et al.* Fucoxantin: a treasure from the sea. **Mar Drugs**, 10, n. 3, p. 604-616, Mar 2012.

DE VECCHI, R.; DAKIC, V.; MATTOS, G.; RIGAUDEAU, A.-S. *et al.* Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted Reconstructed Human Epidermis model in Brazil. **Vigilância Sanitária em Debate**, 6, p. 64, 02/28 2018.

DEHNE, E. M.; HASENBERG, T.; MARX, U. The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma. **Future Sci OA**, 3, n. 2, p. FSO185, Jun 2017.

ESKES, C.; HOFMANN, M. Overview on Current Status of Alternative Methods and Testing Approaches for Skin Irritation Testing *In*: ESKES, C.; MAIBACH, H. I., *et al* (Ed.). **Alternatives for Dermal Toxicity Testing**. Switzerland, 2017. cap. 1, p. 3-24.

EWART, L.; FABRE, K.; CHAKILAM, A.; DRAGAN, Y. *et al.* Navigating tissue chips from development to dissemination: A pharmaceutical industry perspective. **Exp Biol Med (Maywood)**, 242, n. 16, p. 1579-1585, 10 2017.

FDA: Food and Drug Administration, 2012. Lamisil (terbinafine hydrochloride) Highlights of prescribing information. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020539s021lbl.pdf.

GASPAR, L. R.; KAWAKAMI, C. M.; BENEVENUTO, C. G. Overview on the Current Status of Available Test Methods and Additional Promising Methods for Assessing UV-Induced Effects. *In*: AL., C. E. E. (Ed.). **Alternatives for Dermal Toxicity Testing**. AG: © Springer International Publishing, 2017. cap. 33, p. 463.

HARTUNG, T. Perspectives on. **Appl In vitro Toxicol**, 4, n. 4, p. 305-316, Dec 2018.

_____.; VAN VLIET, E.; JAWORSKA, J.; BONILLA, L. *et al.* Systems toxicology. **ALTEX**, 29, n. 2, p. 119-128, 2012.

HASENBERG, T.; MÜHLEDER, S.; DOTZLER, A.; BAUER, S. *et al.* Emulating human microcapillaries in a multi-organ-chip platform. **J Biotechnol**, 216, p. 1-10, Dec 2015.

HEINONEN, T.; VERFAILLIE, C. Key Technologies and Tools. *In*: BALLS, M.; COMBES, R., *et al* (Ed.). **The History of Alternative Test Methods in Toxicology**, 2018. cap. 5.1, p. 265-274.

ICH. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Photosafety evaluation of pharmaceuticals. S10 Guideline 2013.

JENNINGS, P. "The future of *in vitro* toxicology". **Toxicol In vitro**, 29, n. 6, p. 1217-1221, Sep 2015.

KANDAROVA, H.; LIEBSCH, M. The EpiDermTM Phototoxicity Test (EpiDermTM H3D-PT) *In*: AL., C. E. E. (Ed.). **Alternatives for Dermal Toxicity Testing**. Switzerland: Springer International Publishing, 2017. cap. 35.

KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDO VÁ, H.; KANDÁROVÁ, H. *et al.* Phototoxicity of bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. **Toxicol In vitro**, 21, n. 7, p. 1298-1303, Oct 2007.

LELIÈVRE, D.; JUSTINE, P.; CHRISTIAENS, F.; BONAVENTURE, N. *et al.* The EpiSkin phototoxicity assay (EPA): development of an *in vitro* tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. **Toxicol In vitro**, 21, n. 6, p. 977-995, Sep 2007.

MARX, U.; AKABANE, T.; ANDERSSON, T. B.; BAKER, E. *et al.* Biology-inspired microphysiological systems to advance patient benefit and animal welfare in drug development. **ALTEX**, 02 2020.

_____.; ANDERSSON, T. B.; BAHINSKI, A.; BEILMANN, M. *et al.* Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. **ALTEX**, 33, n. 3, p. 272-321, 2016.

MATERNE, E. M.; MASCHMEYER, I.; LORENZ, A. K.; HORLAND, R. *et al.* The multi-organ chip--a microfluidic platform for long-term multi-tissue coculture. **J Vis Exp**, n. 98, p. e52526, Apr 2015.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidance document** on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systematic toxicity tests. **OECD Publishing**, Paris, 2001.

_____. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation*. **OECD Publishing**, Paris, 2014.

_____. Organisation for Economic Co-operation and Development. *In vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. **OECD Publishing**, Paris, pp. 18, 2019.

_____. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD Publishing**, 2004.

TAVARES, R. S. N.; KAWAKAMI, C. M.; PEREIRA, K. C.; DO AMARAL, G. T. *et al.* Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs. Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by *In vitro* Methods. **Antioxidants (Basel)**, 9, n. 4, Apr 2020.

_____; MARIA-ENGLER, S. S.; COLEPICOLO, P.; DEBONSI, H. M. *et al.* Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism **Pharmaceutics**, 136, p. 1-12, 2020.

VICKERS, A. E.; SINCLAIR, J. R.; ZOLLINGER, M.; HEITZ, F. *et al.* Multiple cytochrome P-450s involved in the metabolism of terbinafine suggest a limited potential for drug-drug interactions. **Drug Metab Dispos**, 27, n. 9, p. 1029-1038, Sep 1999.

WORTH, A.; VIEGAS BARROSO, J. F.; BREMER, S.; BURTON, J. *et al.* **Alternative methods for regulatory toxicology – a state-of-the-art review**. 2014.

WORTH, A. P. Types of Toxicity and Applications of Toxicity Testing *In: BALLS, M.; COMBES, R., et al* (Ed.). **The History of Alternative Test Methods in Toxicology**: Andre Wolff, 2018. cap. 1.2, p. 7-10.

WUFUER, M.; LEE, G.; HUR, W.; JEON, B. *et al.* Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment. **Sci Rep**, 6, p. 37471, 11 2016.

YEGANEH, M. H.; MCLACHLAN, A. J. Determination of terbinafine in tissues. **Biomed Chromatogr**, 14, n. 4, p. 261-268, Jun 2000.

YOON NO, D.; LEE, K. H.; LEE, J.; LEE, S. H. 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. **Lab Chip**, 15, n. 19, p. 3822-3837, Oct 2015.

Anexo 01

As Revistas *Antioxidants* e *Pharmaceutics*, onde estão publicados os artigos 1 e 2 da presente tese, são da base MDPI. A base MDPI possui a regra de acesso e de permissões que atesta que os artigos são de propriedade dos autores, podendo por eles ser reproduzido integralmente, ao exemplo da reprodução integral em tese de doutorado. A seguir os dizeres do site e o email de confirmação do mencionado:

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low **Article Processing Charge (APC) (/about/apc)** for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

Acesso em 25/04/2020 (<https://www.mdpi.com/about/openaccess>)

Anexo 02

Renata Spagolla Napoleão Tavares <renatasnt@usp.br>

copyright and licensing permission

Yilia Yu <yilia.yu@mdpi.com>
 Para: Renata Spagolla Napoleão Tavares <renatasnt@usp.br>
 Cc: pharmaceutics@mdpi.com

4 de março de 2020 11:07

Dear Renata,

Thank you for your message. As our journal is Open Access, the copyright belongs to the authors. More detailed information could be found at the below link:
<https://www.mdpi.com/about/openaccess>

Hope this is helpful for you.

Best,
 Yilia

On 2020/3/3 22:46, Renata Spagolla Napoleão Tavares wrote:

Dear Ms Yilia Yu,

I would like to know how to get licensing permission to include the full papers "pharmaceutics-661030" and the submitted "antioxidants-736863" in my thesis.
 Could you help me with this?

Thank you in advance.
 Best regards,
 Renata

--

*MSc **Renata Spagolla Napoleão Tavares*
 Farmacêutica
 FCFRP - USP
 +55 31 995204718

Anexo 03

Comprovante de publicação do Artigo 1: TAVARES, R. S. N.; KAWAKAMI, C. M.; PEREIRA, K. C.; DO AMARAL, G. T. et al. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs. Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by *In vitro* Methods. *Antioxidants*, 9, n. 4, 2020

Anexo 04

Comprovante de publicação do Artigo 2: TAVARES, R. S. N.; MARIA-ENGLER, S. S.; COLEPICCOLO, P.; DEBONSI, H. M. et al. Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism *Pharmaceutics*, 136, p. 1-12, 2020

Anexo 05

Emails de comprovação de submissão do ARTIGO 3 a revista “*International Journal of Pharmaceutics*”, sob o número de referência: IJP-D-20-01177

International Journal of Pharmaceutics <eesserver@eesmail.elsevier.com> 28 de abril de 2020 22:26
 Responder a: International Journal of Pharmaceutics <ijp@elsevier.com>
 Para: renatasnt@usp.br

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Renata Spagolla Napoleão Tavares,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: International Journal of Pharmaceutics
 Title: Toxicity of Topically Applied Drugs beyond Skin Irritation: Static Skin Model vs. Two Organs-on-a-Chip
 Corresponding Author: Lorena Gaspar
 Co-Authors: Renata Spagolla Napoleão Tavares, MSc; Thi P Tao, Master; Ilka Maschmeyer, Ph.D.; Silvy S Maria-Engler, Ph.D.; Monika Schäfer-Korting, Ph.D.; Annika Winter, Ph.D.; Christian Zoschke, Ph.D.; Uwe Marx, Dr;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/ijp/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Renata&lname=Spagolla+Napoleão+Tavares&email=renatasnt@usp.br>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/ijp/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=renatasnt@usp.br>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at lorenagaspar@gmail.com; lorena@fcfrp.usp.br.

Thank you,

International Journal of Pharmaceutics

20/07/2020

E-mail de Universidade de São Paulo - Fwd: Your Submission IJP-D-20-01177

Renata Spagolla Napoleão Tavares <renatasnt@usp.br>

Fwd: Your Submission IJP-D-20-01177

Lorena Rigo Gaspar Cordeiro <lorena@fcfrp.usp.br>
 Para: renatasnt <renatasnt@usp.br>

30 de maio de 2020 20:50

----- Mensagem encaminhada -----

De: International Journal of Pharmaceutics <eesserver@eesmail.elsevier.com>
 Data: sáb, 30 de mai de 2020 às 20:42
 Assunto: Your Submission IJP-D-20-01177
 Para: <lorenagaspar@gmail.com>, <lorena@fcfrp.usp.br>

Ms. Ref. No.: IJP-D-20-01177
 Title: Toxicity of Topically Applied Drugs beyond Skin Irritation: Static Skin Model vs. Two Organs-on-a-Chip
 International Journal of Pharmaceutics or its open access mirror

Dear Dr. Gaspar,

Comments on your paper have now been received and are attached to this message. Please consider all the points made and upon returning your paper detail your responses and the actions taken.

Please submit the revised manuscript by Jul 30, 2020. Upon receipt of your revised paper, we will inform you of the outcome as soon as possible. Papers not received within that time period will be considered to be withdrawn, you are welcome to resubmit your paper as a new submission at a later date.

NOTE: While submitting the revised manuscript, please double check the author names provided in the submission so that authorship related changes are made in the revision stage. If your manuscript is accepted, any authorship change will involve approval from co-authors and respective editor handling the submission and this may cause a significant delay in publishing your manuscript.

PLEASE NOTE: International Journal of Pharmaceutics or its open access mirror would like to invite you to enrich your article by including a list of up to 10 names of chemical compounds studied in the article.

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here: <https://www.elsevier.com/authors/author-services/data-visualization> to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Thank you for submitting your work to the journal.

MethodsX file (optional)

We invite you to submit a method article alongside your research article. This is an opportunity to get full credit for the time and money you have spent on developing research methods, and to increase the visibility and impact of your work. If your research article is accepted, your method article will be automatically transferred over to the open

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=066eb44dd&view=pt&search=all&permmsgid=msg-f%3A1668161349338983395&siml=msg-f%3A1668161349338983395>

1/5

Anexo 06

Comprovante do Comitê de Ética em pesquisa aprovado para o projeto relacionado ao uso de células primárias humanas do ARTIGO 1.

29/04/2020

Plataforma Brasil

BRASIL

principal sair

Lorena Rigo Gaspar Cordeiro - Pesquisador | V3.2

Cadastros Sua sessão expira em: 30min 30

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

☐ DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da fototoxicidade e performance de novos filtros solares de origem marinha.

Pesquisador Responsável: Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55438216.0.0000.5403

Submetido em: 25/04/2016

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

COORDENADOR ORIGINAL

Comprovante de Recepção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_702407