UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Desenvolvimento de Epiderme Humana Reconstruída (RHE)
como plataforma de testes *in vitro* para irritação, sensibilização,
dermatite atópica e fotoimunossupressão**

Tatiana do Nascimento Pedrosa

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

Coorientadora

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Desenvolvimento de Epiderme Humana Reconstruída (RHE)
como plataforma de testes *in vitro* para irritação, sensibilização,
dermatite atópica e fotoimunossupressão**

Tatiana do Nascimento Pedrosa

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Silvyia Stuchi Maria-Engler

Coorientadora:

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P372d	<p>Pedrosa, Tatiana do Nascimento</p> <p>Desenvolvimento de epiderme humana reconstruída (RHE) como plataforma de testes <i>in vitro</i> para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunossupressão / Tatiana do Nascimento Pedrosa. -- São Paulo, 2016.</p> <p>260p</p> <p>Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Maria-Engler, Silvya Stuchi</p> <p>Co-orientador: Barros, Silvia Berlanga de Moraes</p> <p>1. Patologia fisiológica 2. Pele artificial I. T. II. Maria-Engler, Silvya Stuchi, orientador. III. Barros, Silvia Berlanga de Moraes, co-orientador.</p> <p>616.07 CDD</p>
-------	--

Tatiana do Nascimento Pedrosa

**Desenvolvimento de Epiderme Humana Reconstruída (RHE)
como plataforma de testes *in vitro* para irritação, sensibilização,
dermatite atópica e fotoimunossupressão**

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de DOUTOR**

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler
Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

SÃO PAULO, 01 de dezembro de 2016

Ao Prof. Paulo Roberto Castro da Costa (In memoriam) por todo seu incentivo, amizade e conhecimentos repassados a mim. Tenho certeza que hoje você estaria orgulhoso de mim, apesar de também procurar um motivo para reclamar ou apenas me chamar de “gaveta velha”. Sempre sentirei a sua falta!

Aos meus amados pais (Lázaro e Maria), irmãos (Deni, Cris e Dudu), tios (Isabel e Joilgon) e ao amor da minha vida (Glauber). Por serem meu porto seguro, inspiração e motivação para sempre ser melhor. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e por sempre colocar as melhores pessoas e oportunidades no meu caminho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, pela oportunidade de realizar este trabalho, por ter me acolhido e acreditado em meu potencial, por me ajudar a confiar mais no meu potencial. Agradeço imensamente seu carinho, sua paciência (principalmente com a minha ansiedade que não é nada fácil). Obrigada por entender o meu “time”, por se preocupar comigo. Obrigada pela atenção com o meu trabalho, pelo respeito dispensado a ele e a mim. Obrigada por me fazer uma cientista e uma pessoa melhor. Obrigada por sua empolgação e dedicação à ciência; é muito bom lembrar a sua sincera vibração com cada vitória nossa. A senhora é um exemplo de cientista para mim.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, pelas conversas inspiradoras. Obrigada por sua paciência, carinho e disponibilidade. Obrigada pelos e-mails que “me puxavam” para o foco da minha tese e me deixavam atenta com relação aos métodos alternativos ao uso de animais. Obrigada por deixar o laboratório e os congressos mais divertidos, pelos puxões de orelha, por mostrar que a leitura não estava suficiente, que tudo ia ocorrer bem no final. Obrigada por ser minha coorientadora e cooperar conosco para aumentarmos a qualidade deste trabalho.

Ao meu supervisor da bolsa de estágio em pesquisa no exterior (BEPE), Prof. Yves Poumay. Obrigada por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Obrigada por todo o conhecimento repassado a mim. Obrigada por nos presentear com as melhores cervejas do mundo (melhor presente!). Obrigada por todo o suporte oferecido em seu laboratório, realmente me senti parte da equipe. Eu já admirava o pesquisador que eu citava durante boa parte da minha tese e, com o BEPE, passei a admirar a pessoa por trás do pesquisador.

À Sílvia Romano, nossa técnica mais querida. Obrigada por sempre fazer autorizações de final de semana, por sempre me ajudar a montar a estufa seca, por ajudar quando os experimentos ficavam pesados demais, por me ajudar a resolver diversos problemas que não vou contar aqui (risos). Obrigada por sua eficiência e seu nítido carinho com todos do lab. Obrigada por tornar o trabalho das Profas. um pouco mais leve fazendo brilhantemente o seu. Nosso laboratório está muito mal-acostumado com a sua dedicação e o seu carinho, mas por favor, não deixe de ser tão maravilhosa com a gente.

À Renata Albuquerque por toda a sua eficiência, paciência, carinho e amizade. Obrigada por me ajudar a desenhar alguns experimentos para fazermos no citômetro e pelas conversas durante os diversos ensaios. Obrigada pela ajuda com a análise dos dados. Obrigada pelo carinho, amizade e incentivo que sempre dispensou a mim.

Aos meus colegas de laboratório pelos bons momentos que passamos juntos, pela amizade, pelos ensinamentos e pela companhia. Em especial eu gostaria de agradecer à Paula Pennacchi que sempre foi inspiradora, um exemplo de organização e comprometimento com todo o laboratório. Muito obrigada pelo treinamento, por ajudar sempre, por me ensinar. Agradeço a Manoela por todas as discussões que me inspiraram e fizeram este trabalho ficar ainda mais bonito, sei que você nunca lembra o que falou de importante para mim (por ex.: Tati, você já pensou em usar meio condicionado de fibroblastos?), mas eu lembro e agradeço. Não posso deixar de agradecer a Andréa, afinal, me recebeu tão bem no meu estágio no mestrado, me ensinou e me ensina tanta coisa até hoje. Obrigada por ter se tornado além de tudo uma amiga muito especial. Agradeço a Nayane, a

Érica e a Gabi por compartilhar o vício em “Master Chef” e a dureza de acordar cedo no outro dia para ir ao lab, pelas conversas super animadas. Nay e Érica, agradeço pelos momentos divertidos, pela amizade, por nossas conversas sobre política, desigualdade social, racismo... Vocês são excelentes pesquisadoras e ótimas companheiras. Gabi, agradeço por ter sido minha IC. Aprendi muito contigo e espero que você tenha aprendido comigo também. Espero que você tenha entendido o fato de eu ser sempre tão exigente (para não dizer chata). Michele (Mi), muito obrigada por sempre ajudar nas minhas dúvidas, por fortalecer o pequeno time das farmacêuticas no lab, por ser tão engraçada e por fazer um bolo de milho e um chili tão gostosos. Debs, obrigada por ser sempre tão doce, obrigada por sua gentileza e paciência. Fer, obrigada por ser inspiradora, por ser sempre tão solícita. Só posso agradecer a sua alegria e amizade. Carol, obrigada por partilhar comigo as dores e as vitórias no desenvolvimento da epiderme. Thalita, obrigada pelas correções nos trabalhos, obrigada por proporcionar a parceria no seu trabalho. Octávio, obrigada por me ensinar a imunofluorescência e por ser tão brilhante. Desejo todo sucesso do mundo a todos.

Aos amigos que fiz na Bélgica, principalmente Evelyne, Valerie e Abdalah. Vocês tornaram o laboratório e a minha estadia na Bélgica muito divertidos. Abdalah, eu agradeço por me ensinar desde o caminho para o laboratório até as análises estatísticas. Evelyne, você sempre será uma grande amiga, obrigada por todo o conhecimento que você repassou para mim, pelas críticas construtivas e pelos elogios sinceros. Obrigada por se preocupar comigo, pelas infinitas horas de conversas no “coffee-time” ou nas horas que você me ensinava onde estava tudo e como fazer os experimentos. Evelyne e Abdalah, vocês foram ótimos coautores e foram essenciais para que eu conseguisse elevar a qualidade da escrita do paper. Obrigada pela dedicação e pelas inúmeras vezes que discutiram e corrigiram o paper comigo. Valerie, muito obrigada por ser uma técnica tão dedicada, por ter sido tão divertida e preocupada comigo. Obrigada por me ajudar no preparo das caipirinhas no churrasco e no preparo dos reagentes no laboratório, sei que essa parte foi mais importante, mas a primeira foi mais divertida... Adorei deixar uma belga treinada para fazer um dos melhores drinks do mundo. Obrigada por achar legal ter que falar inglês comigo. Celine, Joanna e Benuart obrigada pelo carinho e amizade. Benuart obrigada por me ensinar onde tava tudo, por seu apoio técnico e por ter feito os experimentos que a revista pediu depois que voltei para o Brasil. Dr. Catherine obrigada por todo o apoio e preocupação, por preparar tudo para que eu fosse muito bem recebida em seu laboratório. Obrigada pelas correções, quero um dia escrever tão bem quanto você. A todos os outros pesquisadores e funcionários brilhantes que conheci durante esse período, muito obrigada.

Aos colegas do laboratório de bioquímica, à Profa. Ana Campa e a Silene em especial, por sempre nos socorrerem e pela ótima vizinhança.

À todos os funcionários da FCF, principalmente à Claudinha e as moças da limpeza. Claudinha, seu café é santo! Muito obrigada por todo o seu carinho conosco sempre.

À minha banca de qualificação de doutorado: Prof. Dr. Carlos Frederico Menck, Dra. Vanessa Rocha e Prof. Dr. Sandro Almeida, vocês contribuíram muito para este trabalho.

À minha banca de doutorado pela disponibilidade em ler meu trabalho e avaliá-lo. Agradeço as contribuições.

Aos queridos amigos que fiz em SP (Gabi, Nobuiki e Pri), aos amigos que são um pedacinho da minha terra em SP (Manaus) e que graça a Deus, vieram estudar ou trabalhar aqui no mesmo período que eu (Ana Elisa, Rubelmar, Ana Cláudia e Vivian) e aos conterrâneos que conheci aqui (Carla, Jaime e Gustavo) meu muito

obrigada. Vocês fizeram a minha vida muito mais leve e feliz nesses anos de doutorado, principalmente neste último ano que ainda nos tornamos vizinhos e montamos a república manauara do irã, ocupando quase todo o prédio da Vanessa (risos). Obrigada pelas risadas, pelas várias noites de pizza ou macarronada, pelos bolos e cafés, e, principalmente pelos empréstimos de itens da dispensa que não pude repor enquanto escrevia essa tese (risos). Obrigada pelo ombro amigo e por serem a minha família aqui em São Paulo. Pri você foi a irmãzinha japonesa que Deus me deu, obrigada por me acolher e oferecer sua amizade numa época tão difícil para mim, você sempre será a melhor amiga de república que eu já tive. Ana e Vivian, obrigada pela amizade de vocês, por terem sido minhas grandes irmãs aqui em SP. Obrigada por lerem meus textões, por compartilharem opiniões, por serem sinceras sempre. Obrigada pelos passeios e por toda a diversão que me proporcionaram. Obrigada pelo ombro amigo na hora do choro. Vivian, já falei que você é “nó cega”, mas eu te amo? (risos) Aos meus amigos manauaras em SP, obrigada pela ajuda com as figuras do meu artigo ou por discutirem ciência comigo e principalmente pelo incentivo e amizade. Jaime e Rubelmar, obrigada pelo esforço em tentar me ajudar com as figuras do paper. Gustavo, obrigada pela ajuda com os cálculos, informática e compras na padaria rsrs. Carla, obrigada pelas conversas, por me distrair e acalmar. Gabi, obrigada por sua amizade sem igual pelos inúmeros almoços no bandeirão da USP, cafés no 19, pelo ombro amigo na hora do choro, enfim, tantas coisas que com a sua amizade tornaram o meu doutorado mais leve.

Aos meus amigos que estão em Manaus mas que nunca deixaram de oferecer um ombro amigo enquanto estive aqui. Muito obrigada pela disponibilidade, pelo carinho, pela paciência, enfim, por todo amor que vocês me ofereceram. À minha amiga de infância Tiane, sua Bia e sua família que sempre torceram muito por mim. Ao Caio e a Gleyce meus parceiros e afilhados, à amizade e apoio de vocês. Chanderlei, Dani, Nat, Vivi, Leidy, Jamelow, Marne, Zanair, Rodrigo, Gess, Juliana e Odacy, só posso agradecer a maravilhosa amizade e apoio. Muito bom sempre poder revê-los e sentir o mesmo carinho de sempre toda vez que vou à Manaus.

Aos meus professores da FCF-UFAM por todo o conhecimento que repassaram a mim, por me inspirarem por me incentivarem, por demonstrarem orgulho real por cada novo passo que eu dava. Agradeço especialmente a Profa. MSc. Elisa Meneghini, ao Prof. Dr. Emerson Lima e a Profa. Dra. Marne Vasconcellos. Vocês são exemplo de educadores e pesquisadores para mim. Marne, você é a culpada por esse doutorado! (risos) Obrigada por insistir, obrigada por ver que eu deveria estar aqui para crescer como ser humano e como profissional.

Aos meus sogros (Nelci e Romão), cunhados (Mayra e Jeferson) e às minhas sobrinhas (Ágata e Alanis) por todo o carinho e compreensão, por serem minha família em SP e por torcerem por mim sempre.

Ao meu marido por ser sempre tão empolgado com o meu trabalho, por me motivar a crescer sempre, por fazer eu me sentir a pessoa mais amada desse mundo. Obrigada por vir ao laboratório comigo nos finais de semana, por ouvir mil vezes as minhas apresentações e corrigi-las para que ficassem sempre melhores. Eu sou muito grata pelo seu amor, por mostrar que juntos somos muito melhores e por ser a melhor coisa que aconteceu em SP. Não consigo acreditar que eu mereço toda a felicidade que você me proporcionou e me proporciona todos os dias. Te amo!

Aos meus pais por terem feito o possível e impossível para que eu tivesse o único tesouro que ninguém pode tirar de mim: a educação. Espero que hoje eu tenha dado uma imensa alegria para vocês. Deni, Cris e Dudu, amo vocês! Obrigada por todo amor e carinho. Vocês foram minha fortaleza. Isabel e Joílgon, vocês foram exemplos para mim. Obrigada pela motivação, pelo carinho, pelo apoio nos momentos de aperto em SP. Não tenho palavras para agradecê-los. Pai, você queria uma filha doutora, acredito que a banca vai me aprovar

(risos) então se você estiver lendo esses agradecimentos, é porque deu certo, sou doutora em farmácia pela USP!
(risos) Sei que no início era uma doutora médica que o Sr queria, no entanto, espero que esse título dê pro gasto

A todos que direta ou indiretamente me apoiaram, me incentivaram e tornaram possível a realização deste sonho, meu muito obrigada.

Ao programa de pós-graduação em farmácia, em especial ao Irineu, Marilise, Suefy e Edna, por toda paciência, pela simpatia sempre presente quando os perturbava, enfim por todos os serviços prestados.

Ao CNPq- INCT-IF e RENAMA pelo auxílio financeiro.

À FAPESP pelo auxílio financeiro provenientes dos projetos: 2013/12682-9, 2011/07441-7, 2011/14327-6; 2011/22812-1; 2013/00735-0; 2014/24400-0.

PREFÁCIO

Esta tese é composta de quatro capítulos, cujas abordagens discutem o desenvolvimento e a utilização de epiderme humana reconstruída (RHE, *Reconstructed human epidermis*) como plataforma de testes *in vitro* para irritação, sensibilização, dermatite atópica e efeitos da radiação UV.

O Capítulo 1 corresponde ao desenvolvimento e a utilização da RHE como plataforma de testes para ensaios de irritação cutânea *in vitro*. Neste capítulo, demonstramos o desenvolvimento de um RHE semelhante aos modelos validados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) cujos parâmetros de qualidade e funcionalidade (distinção entre agentes irritantes e não irritantes) estão em acordância com o guia OECD n.º 439. Adicionalmente, os estudos realizados para a finalização deste capítulo geraram dois artigos a serem submetidos ao periódico “Toxicology In Vitro”, o primeiro intitulado “*A new Reconstructed Human Epidermis (RHE) for in vitro skin Irritation testing*” e o segundo intitulado “*Growth factor combinations are essential for successful development of reconstructed human epidermis*” (**apêndices 2 e 3**).

O capítulo 2 apresenta o desenvolvimento do modelo de RHE imunocompetente e seu uso para avaliação de sensibilização cutânea *in vitro*. O modelo de RHE imunocompetente baseia-se em um cross-talking entre o RHE e a linhagem celular THP-1, que demonstrou ser responsivo aos ensaios de sensibilização *in vitro* distinguindo adequadamente entre agentes sensibilizantes e não-sensibilizantes. Tal modelo demonstrou-se promissor para ensaios de avaliação de ativação de resposta imune *in vitro*.

O capítulo 3 corresponde aos resultados obtidos durante o período da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), o “doutorado sanduíche”. Tais resultados foram obtidos sob orientação do Prof. Yves Poumay (LabCeti, Universidade de Namur, Bélgica) e da Profa. Silvy Stuchi Maria-Engler, durante o período de março a julho de 2016. Neste capítulo demonstramos o papel de citocinas do tipo Th2 e da depleção de colesterol na membrana plasmática (DCMP) na indução de um perfil de dermatite atópica (DA) *in vitro* em um modelo de RHE. Os resultados obtidos nesse capítulo demonstram que as interleucinas IL-4, IL-13 e IL-25 quando em conjunto com a DCMP conseguem mimetizar os efeitos morfológicos e moleculares da DA *in vitro*. Tais resultados encontram-se publicados no periódico “*Archives of Dermatological Research*” no paper intitulado “*Methyl- β -cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model*” (**apêndice 4**).

No capítulo 4, finalizamos esta tese apresentando a avaliação dos efeitos imunossupressores da radiação ultravioleta em RHE. Os ensaios foram realizados em diferentes períodos (24 h e 72 h), entretanto, não observamos efeitos fotoimunossupressores no RHE. Tais resultados justificam-se pela ausência da liberação de IL-10 pelo RHE imunocompetente, por exemplo, e demonstram uma limitação do RHE imunocompetente para avaliações de redução da resposta imune.

Analisando todos os experimentos e resultados obtidos nesta tese, concluímos que o modelo de RHE (USP-RHE) desenvolvido encontra-se pronto para ensaios de validação e apresenta-se como uma alternativa promissora para a implementação de metodologias alternativas ao uso de animais em nosso país. Tal modelo apresentou-se como uma plataforma promissora para avaliação de irritação e sensibilização cutâneas, bem como uma plataforma para pesquisa de novos fármacos para tratamentos da dermatite atópica.

PEDROSA, T. N. Desenvolvimento de Epiderme Humana Reconstruída (RHE) como plataforma de testes *in vitro* para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunossupressão. 236p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

RESUMO

O desenvolvimento de novos modelos de pele e novas metodologias *in vitro* segue uma tendência mundial na busca pela redução ou substituição de testes em animais. Nesse contexto, kits de epiderme humana reconstruída (RHE) apresentam-se como uma plataforma promissoras para essa proposta e, alguns modelos encontram-se validados para ensaios de irritação e corrosão cutânea *in vitro*. Entretanto, em países como o Brasil, enfrentam-se questões alfandegárias e perda do material por perecibilidade, dificultando e até impedindo, a importação desses kits para utilização por parte das indústrias e laboratórios nacionais. Em contrapartida, o desenvolvimento de um modelo de RHE apresenta-se como um avanço tecnológico e ganho de autonomia para esses países. Assim, no capítulo 1 explorou-se o desenvolvimento de um modelo nacional de RHE (USP-RHE) que atendesse às exigências internacionais descritas no guia OECD 439. O modelo desenvolvido apresentou uma epiderme bem diferenciada e atendeu aos parâmetros de qualidade (histologia, viabilidade e função barreira) bem como da funcionalidade, a qual é expressa na capacidade de distinção entre irritantes e não irritantes, apresentando 85,7% de especificidade, 100% sensibilidade e 92,3% de acurácia quando comparada com a classificação *in vivo* obtida pelo ensaio do linfonodo local (LLNA). No capítulo 2, células monocíticas THP-1 em monocamada foram capazes de distinguir entre agentes sensibilizantes e não sensibilizantes por meio da expressão de CD86, CD54 e liberação de IL-8. Após a obtenção de RHE e THP-1 funcionais, um cross-talking foi estabelecido gerando uma RHE imunocompetente. A RHEI distinguiu satisfatoriamente entre agentes sensibilizantes e não sensibilizantes por meio da expressão de CD86 e CD54 na membrana das células THP-1. A liberação de IL-8 também foi avaliada na RHEI, mas, não demonstrou ser um bom indicador para a avaliação de sensibilização, ao contrário de IL-1 α , que distinguiu satisfatoriamente agentes sensibilizantes de não-sensibilizantes, mas não foi capaz de hierarquizá-los. No capítulo 3, avaliou-se o papel de interleucinas do tipo Th2 e da depleção de colesterol na membrana plasmática no desenvolvimento de características morfológicas e moleculares da dermatite atópica (DA) *in vitro* em um modelo de RHE. Os resultados demonstram que o uso de IL-4, IL-13 e IL-25 em combinação com a depleção de colesterol na membrana plasmática mimetiza *in vitro*, as principais características da DA. No capítulo 4, buscou-se avaliar os efeitos imunossupressores da radiação ultravioleta na RHEI. Os ensaios foram realizados em diferentes períodos de exposição, entretanto, não foi possível observar tais efeitos. Os resultados justificam-se pela ausência da liberação de IL-10 pelo RHE imunocompetente, por exemplo, e demonstram uma limitação do RHE imunocompetente para avaliações de inativação da reposta imune. Neste trabalho, concluímos que foi possível obter uma RHE competitiva, similar aos modelos internacionais validados e que pode ser utilizada como plataforma para ensaios de irritação e sensibilização cutânea, além de ser uma plataforma para estudos da dermatite atópica. No modelo é possível estudar a ativação do sistema imune, o que o torna promissor como uma plataforma para avaliação de resposta imunológica *in vitro*. Conclui-se, portanto, que os objetivos foram amplamente atendidos além de oferecermos um protocolo de livre acesso para reprodução por outros laboratórios e um modelo para validação futura.

Palavras-chave: Avaliação de segurança, epiderme humana reconstruída, testes *in vitro*, dermatite atópica.

PEDROSA, T. N. Development of a Reconstructed Human Epidermis (RHE) as platform to *in vitro* assays: irritation, sensitization, atopic dermatitis and photoimmunosuppression. 236p. (PhD Thesis). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ABSTRACT

The development of new *in vitro* skin models and new methodologies follows a global trend in search for reductions or replacement of animal testing. In this context, Reconstructed Human Epidermis kits (RHE) are presented as a promising platform in the search for alternative methods to animal use, and some models are validated for skin irritation and corrosion *in vitro* tests. However, in countries such as Brazil, who face customs issues and loss of material due to perishability, making it challenging and even compromising the importation of these kits for use by industries and laboratories. In contrast, the development of an RHE model is presented as a technological breakthrough and gain of autonomy for these countries. Thus, in Chapter 1 we explored the development of a national model of RHE (USP-RHE) that meet international requirements described in OECD TG 439. The developed model presented a well-differentiated epidermis and met the quality parameters, for instance, histology, viability, and barrier function as well as the functionality expressed in the capacity of screening between irritants and non-irritants, with 85.7 % of specificity, 100 % of sensitivity and 91.7% of accuracy in comparison to *in vivo* UN GHS classification from Local lymph node assay (LLNA). In chapter 2, monocytic THP-1 cell line, as monolayers, were able to distinguish between sensitizers and non-sensitizers by expression of CD86, CD54, and IL-8 release. In this model, functional RHE and THP-1 were used in a cross-talking, and thus an immunocompetent RHE (RHEI) was generated. The RHEI has distinguished satisfactorily between sensitizers and non-sensitizers through CD86 and CD54 expression that was larger and more sensitive in this model. The release of IL-8 was also evaluated in RHEI, however, did not demonstrate to be a good parameter for this evaluation, unlike IL-1 α , which satisfactorily distinguished sensitizers from non-sensitizers, but was not able to hierarchize them. In chapter 3, we evaluated the role of Th2-related cytokines and plasma membrane cholesterol depletion (CD) in the development of atopic dermatitis (AD) morphological and molecular characteristics in an *in vitro* model of RHE. The results showed that combination of IL-4, IL-13 and IL-25 in combination with CD can reproduce the major features of AD *in vitro*. In Chapter 4, we sought to evaluate the ultraviolet radiation-induced immunosuppressive effects in RHE. The tests were performed at different times. However, it was not possible to observe such effects. The results are justified by the absence of IL-10 release by RHEI, for example, and show a limitation of RHEI for rating inactivation of the immune response. In this work, we conclude that it was possible to obtain a competitive RHE similar to the validated international models that can be used as a platform for irritation and skin sensitization tests, besides being a platform for the study of atopic dermatitis. Using this model is possible to explore the activation of immune system, which makes it promising as a platform for the evaluation of immune response *in vitro*. We conclude, therefore, that the objectives have been met as well as it is offering an open source protocol for breeding by other laboratories, thus offering the RHE model developed here for future validation tests.

Keywords: Safety assessment, artificial skin, *in vitro* tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo dos eventos ocorridos na União Europeia (UE) até a proibição completa do uso de animais para fins cosméticos em março de 2013.	27
Figura 2 – Histórico brasileiro de eventos visando a proibição de testes em animais.	30
Figura 3 – Representação dos ensaios para determinação de contaminantes.....	42
Figura 4 – Padronização da diferenciação epidérmica sobre membrana <i>transwell</i>	44
Figura 5 – Quadro comparativo entre a (a) epiderme humana, (b) nosso modelo de equivalente de epiderme e os modelos validados pelo Guia OECD 439 para ensaios de irritação (c) SkinEthic™ RHE, (d) EpiSkin model, (e) EpiDerm™ Tissue Model e (f) LabCyte EPI-MODEL.....	46
Figura 6 – A. Coloração diferencial por Hematoxilina e Eosina (HE). B. imunomarcação para citoqueratina 10 (CK10). C. imunomarcação para citoqueratina 14 (CK14). Aumento 20X. (bar= 200 µm).....	47
Figura 7 – Avaliação da integridade da função barreira do equivalente de epiderme.	49
Figura 8 – Ensaio de irritação segundo o Guia OECD 439. C(-) – Controle negativo (PBS), C(+) – Controle positivo (SDS 5 %) e, KOH 5 % (hidróxido de potássio 5 %). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão de experimentos independentes (n=3). (**) p < 0,01; e, (***) p < 0,001.	50
Figura 9 – Mecanismos subjacentes à sensibilização cutânea durante as fases de sensibilização e de elicitação: (1) Os haptenos penetram a epiderme viável; (2) A ligação de haptenos e proteínas da pele; (3) As células de Langerhans (LCs) ligam-se ao complexo hapteno-proteína e diferenciam-se em células dendríticas (DCs) maduras durante a migração para o nódulo linfático; (4) LCs apresentam as proteínas conjugadas a hapteno aos linfócitos-T naive; (5) Expansão clonal das células T efectoras (naive) e de memória específicas; (6) Proliferação de linfócitos T que difundem-se para a circulação sanguínea, resultando na sensibilização do indivíduo; (7) Re-exposição de haptenos semelhantes para o mesmo indivíduo; (8) Liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células epidérmicas; (9) Infiltração de células T a partir de vasos sanguíneos no local de contato; (10) Desenvolvimento de dermatite de contato alérgica (DCA).....	67

Figura 10 – Diagrama esquemático que resume os passos envolvidos na realização dos ensaios <i>in vitro</i> atualmente disponíveis e validados pela OECD para a avaliação do potencial de sensibilização cutâneo.....	71
Figura 11 – Liberação de IL-8 pela linhagem THP-1 após 24 h de exposição a compostos sensibilizantes e não sensibilizantes.....	79
Figura 12 – Ilustração representativa da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI). O modelo compreende um <i>crosstalk</i> entre uma epiderme humana reconstruída (RHE) desenvolvida sobre uma membrana <i>transwell</i> e células THP-1 submersas em meio de cultura no compartimento inferior.	80
Figura 13 – Viabilidade do equivalente de epiderme e da THP-1 após exposição do EEI aos compostos. A. Viabilidade do equivalente de epiderme após exposição aos compostos. B. Viabilidade da célula THP-1 em <i>cross talk</i>	81
Figura 14 – Fotomicrografias representativas da histologia das epidermes após tratamento ou não com os agentes sensibilizantes.	82
Figura 15 – Expressão dos marcadores CD86 e CD54 em valores de RFI (<i>Relative Fluorescence Index</i>) após exposição aos compostos da linhagem THP-1 em monocultivo ou em <i>cross talk</i> no equivalente de epiderme imunocompetente (EEI).....	83
Figura 16 – Liberação de IL-8 e IL-1 α pelo EEI após 24 h de exposição a compostos sensibilizantes e não sensibilizantes.....	84
Figura 17 – Vias imunológicas da Dermatite Atópica (DA).....	97
Figura 18 – Comparação entre cortes histológicos obtidos a partir de biópsias de (A) pele saudável e (B) pele com dermatite atópica, e, (C) Epiderme Humana Reconstruída (RHE) tratado por 2 horas com M β CD, seguido por tratamento com IL-4, IL-13 e IL-25 (IL MIX) por 48 h demonstrando que apresenta as características morfológicas da dermatite atópica (DA) <i>in vivo</i> . É possível observar que o RHE-DA apresenta características presentes na pele humana atópica como por exemplo, hipogranulose, espongiase e diminuição do estrato córneo. Barras de escala = 50 um.....	99
Figura 19 – Alterações morfológicas do RHE após os tratamentos.	105
Figura 20 – Avaliação da função barreira do RHE.	107
Figura 21 – Imunofluorescência para avaliação da expressão de anidrase carbônica II em RHE.	108
Figura 22 – Intensidade de fluorescência após a marcação com anticorpo anti-CA2.....	109
Figura 23 – Avaliação da expressão gênica de anidrase carbônica II (CA2) em RHE.....	109

Figura 24 – Imunofluorescência para avaliação da expressão de loricrina em RHE.	111
Figura 25 – Avaliação da expressão gênica de marcadores de diferenciação epidérmica expressos nas camadas superiores da epiderme.	112
Figura 26 – Avaliação da expressão gênica de marcadores de dermatite atópica.	114
Figura 27 – Desfechos da Luz UV na pele.	127
Figura 28 – Resumo dos efeitos da radiação UV na pele.	128
Figura 29 – Alguns mecanismos moleculares que desencadeiam a fotoimunossupressão. ..	131
Figura 30 – Representação esquemática dos ensaios para avaliação do efeito imunossupressor da radiação solar em equivalente de epiderme imunocompetente.	136
Figura 31 – Efeitos do espectro de radiação solar que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV) em epiderme humana reconstruída (RHE).	137
Figura 32 – Efeitos da radiação UVB em epiderme humana reconstruída (RHE).	138
Figura 33 – Efeitos da radiação UVA em epiderme humana reconstruída (RHE).	138
Figura 34 – Viabilidade da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) 24h após exposição a 5 J/cm ² de radiação que mimetiza o sol do meio dia (ssUV).	140
Figura 35 – Avaliação de danos oxidativos do tipo 8-Oxo-dG (8-Oxo-2'-deoxiguanosina) no DNA. Avaliação imunohistoquímica do RHE 24 h após exposição a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV). A – Controle negativo, B – ssUV 2,5 J/cm ² , C – ssUV 5 J/cm ² , e, D - ssUV 10 J/cm ²	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos no Brasil.....	29
Tabela 2 – Fatores de crescimento comumente utilizados para o desenvolvimento de equivalentes de pele e de epiderme.....	32
Tabela 3 – Parâmetros dos protocolos específicos para cada um dos métodos validados pelo guia OECD 439 em comparação com os parâmetros definidos para nosso modelo de epiderme humana reconstruída (USP-RHE)	52
Tabela 4 – Avaliação de microrganismos na cultura primária e perfil dos pacientes.	43
Tabela 5 – Valores de densidade óptica (DO) para o controle negativo em ensaio de MTT para o USP-RHE e os modelos validados e descritos no Guia OECD 439.....	48
Tabela 6 – Comparação entre a função barreira obtida para o nosso modelo de equivalente de epiderme (USP-RHE)) e os modelos de epidermes validados para ensaios de irritação segundo o guia OECD 439	49
Tabela 7 – Comparação entre os resultados obtidos para os ensaios de avaliação da irritação cutânea segundo a categoria GHS UN (classificação baseada em ensaios <i>in vivo</i>), métodos de referência validados pela OECD (VRM) e o modelo USP-RHE de acordo com o guia OECD 439	51
Tabela 8 – Ensaio de citotoxicidade da linhagem monocítica THP-1 por iodeto de propídeo.	77
Tabela 9 – Avaliação da expressão dos marcadores CD86 e CD54 após exposição da linhagem THP-1 a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes.....	78
Tabela 10 – Comparação entre a menor concentração testada na RHEI e as concentrações que não causam sensibilização em humanos de acordo com o Teste de Contato Repetitivo em Humanos (HRIPT)	85
Tabela 11 – Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-qPCR	103
Tabela 12 – Avaliação da expressão dos marcadores CD86 e CD54 após 24h ou 72h da exposição ou não da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a 5 J/cm ² de radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV) e exposto ou não a agentes sensibilizantes	141

LISTA DE SIGLAS

AL – Ácido Lático

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOP – *Adverse Outcome Pathway*

BRACVAM – Centro Brasileiro para Validação de Metodologias Alternativas

cDNA – DNA complementar

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHS – reações de hipersensibilidade de contato / *Contact hypersensitivity*

CI50 – Concentração inibitória 50 %

CK10 – Citoqueratina 10

CK14 – Citoqueratina 14

CONCEA – Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal

CMV – Citomegalovírus

CV75 – Concentração correspondente a 75 % de viabilidade celular

DCA – Dermatite de Contato Alérgica

DCI – Dermatite de contato irritativa

DCs – Células Dendríticas

DCMP – Depleção de Colesterol na Membrana Plasmática

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNCB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

DO – Densidade óptica

DPRA – Ensaio de Reatividade Direta de Peptídeo / *Direct peptide reactivity assay*

EC50 – Concentração que reduz a viabilidade em 50 %

ECVAM – Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos

EGF – *Epidermal Growth Factor*

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EP – Equivalente de Pele

ET50 – Tempo de exposição que reduz a viabilidade em 50 %

Eu – eugenol

EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing)

FCF-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

FDA – *Food and Drug Administration*

FGF – *Fibroblast Growth Factor*

FITC – Isotiocianato de fluoresceína / *fluorescein isothiocyanate*

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz

h-CLAT – Teste de ativação de célula humana / *human Cell Line Activation Test*

HBV – Vírus da Hepatite B

HC – Hospital das Clínicas

HCV – Vírus da Hepatite C

HE – Hematoxilina e Eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPV – Papiloma vírus humano

HRIPT – *Human repeat insult patch testing*

HSV-1 – Herpes simplex virus 1

HSV-2 – Herpes simplex virus2

HU – Hospital Universitário

IC50 – concentração de uma substância que reduz a viabilidade celular do equivalente de epiderme em 50%

IHC – Imunohistoquímica

IL-10 – Interleucina 10

ITS – Estratégia Integrada de Testes / *integrated testing strategy*

KCl – Cloreto de potássio

KGF – *Keratinocyte Growth Factor*

LC – Células de Langerhans

LLNA – Local Lymph Node Assay

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NBZ – brometo de 4-nitrobenzilo

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico / *Organisation for Economic Co-operation and Development*

PBS – Tampão fosfato-salino / *phosphate buffered saline*

PCR – reação em cadeia da polimerase / *Polymerase Chain Reaction*

PE – *R-Phycoerythrin*

PI – Iodeto de Propídeo

RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos

RES – Resorcinol

RFI – *Relative Fluorescence Intensity*

RGM – Meio de Rheinwald e Green

RHE – *Reconstructed Human Epidermis* / Epiderme Humana Reconstruída

RHEI – Epiderme humana reconstruída imunocompetente

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*

RUV – Radiação Ultravioleta

SFB – Soro fetal Bovino

TGF- α – *Transforming growth factor – alpha*

UE – União Europeia

UEM – Universidade Estadual de Maringá

U/mL – unidades por mililitro

UVA – Radiação ultravioleta A

UVB – Radiação ultravioleta B

UVC – Radiação ultravioleta C

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VRM – modelos de referência validados / *validate reference methods*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Desenvolvimento da epiderme humana reconstruída (RHE) e seu uso para ensaios para avaliação de irritação cutânea <i>in vitro</i>	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Métodos alternativos ao uso de animais	27
1.1. Desenvolvimento de Equivalentes de Epiderme visando seu uso como método alternativo ao uso de animais.....	30
1.3. Avaliação de irritação cutânea <i>in vitro</i>	34
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo Geral.....	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1. Obtenção de células primárias humanas	37
3.2. Controle de qualidade de células primárias humanas	38
3.3. Geração da epiderme humana reconstruída (RHE).....	38
3.4. Controle de qualidade do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE)....	39
3.4.1. Morfologia e imunohistoquímica	39
3.4.2. Viabilidade celular do controle negativo.....	39
3.4.3. Avaliação da função barreira do RHE - Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50)	40
3.5. Aplicabilidade do protocolo USP-RHE para ensaios de avaliação de irritação cutânea <i>in vitro</i>	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Obtenção de células para cultura primária	42
4.1.1. Controle de qualidade das culturas primárias.....	42
4.2. Geração da epiderme humana reconstruída (RHE).....	43
4.3. Controle de qualidade do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE)....	46
4.3.1. Avaliação histológica e imunohistoquímica.....	46
4.3.2. Viabilidade celular do controle negativo.....	48
4.3.3. Avaliação da função barreira do RHE - Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50)	48

4.3.4. Aplicabilidade do protocolo USP-RHE para ensaios de avaliação de irritação cutânea <i>in vitro</i> (Segundo OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 439 – <i>In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method</i>).....	50
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de ensaios de sensibilização em epiderme humana reconstruída (RHE) em co-cultura com células monocíticas THP-1	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
1.1. Sensibilização cutânea	66
1.2. Métodos validados para avaliação de sensibilização cutânea <i>in vitro</i>	68
1.2.1. DPRA (direct peptide reactivity assay)	68
1.2.2. KeratinoSens™	69
1.2.3. h-CLAT (Human Cell line activation test).....	69
2. OBJETIVOS	72
2.1. Objetivo Geral.....	72
2.2. Objetivos específicos	72
3. METODOLOGIA.....	73
3.1. Avaliação da toxicidade de compostos sensibilizantes e não sensibilizantes sobre a epiderme humana reconstruída (RHE) por ensaio de MTT	73
3.2. Avaliação da qualidade e funcionalidade da linhagem celular THP-1	73
3.2.1. Cultura da linhagem de células monocíticas (THP-1).....	73
3.2.2. Análise do fenótipo celular por citometria de fluxo.....	74
3.2.3. Avaliação da secreção de interleucina-8 (IL-8) pelas células THP-1 após exposição a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes	74
3.3. Geração da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) (<i>cross talk</i> THP-1/RHE)	74
3.3.1. Exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a substâncias conhecidas sensibilizantes e não sensibilizantes para avaliação da funcionalidade do modelo frente a ensaios de sensibilização	75
4. RESULTADOS	76
4.1. Avaliação da funcionalidade da linhagem celular THP-1 – <i>Human cell line activation test</i> (h-Clat)	76

4.1.1. Obtenção da CV75 por estudo da citotoxicidade por iodeto de propídeo (PI).	76
4.1.2. Sensibilização da linhagem THP-1 no h-Clat – Expressão de CD86 e CD54 após exposição a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes.....	77
4.2. Avaliação da secreção de IL-8 pela linhagem monocítica THP-1 após exposição a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes	78
4.3. Geração do modelo de equivalente de epiderme imunocompetente.....	79
4.4. Funcionalidade do modelo de epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI)	80
4.4.1. Avaliação da citotoxicidade dos compostos em equivalente de epiderme imunocompetente (EEI)	80
4.4.2. Avaliação da expressão dos marcadores CD86 e CD54 na linhagem celular THP-1 após exposição do EEI aos agentes sensibilizantes e não sensibilizantes	82
4.4.3. Avaliação da liberação de citocinas após exposição do EEI aos agentes sensibilizantes e não sensibilizantes.....	83
4.5. Comparação entre os resultados obtidos para a epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) e os resultados em humanos	85
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS	91
CAPÍTULO 3 – Papel de citocinas do tipo Th2 e depleção de colesterol na membrana plasmática no desenvolvimento de um modelo de dermatite atópica <i>in vitro</i>	95
1. INTRODUÇÃO.....	96
1.1. Dermatite atópica	96
2. OBJETIVOS	100
2.1. Objetivo Geral.....	100
2.2 Objetivos específicos	100
3. METODOLOGIA.....	101
3.1. Cultura de células e produção da epiderme humana reconstruída (RHE)	101
3.2. Avaliação morfológica e imunofluorescência.....	101
3.3. Avaliação de função barreira do modelo por meio de avaliação de resistência elétrica trans-epitelial (TEER) e da permeação ao corante lucifer yellow (LY)	102
3.4. Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR	102
4. RESULTADOS	104

4.1. Efeitos morfológicos do uso das interleucinas IL-4, IL-13 e IL-25 e depleção de colesterol na membrana plasmática dos queratinócitos na epiderme humana reconstruída (RHE).....	104
4.2. Alterações na função barreira do RHE	106
4.3. Avaliação da expressão da anidrase carbônica II.....	107
4.4. Avaliação dos marcadores de integridade de barreira epidérmica, loricrina (LOR) e filagrina (FLG)	110
4.5. Avaliação da expressão gênica de marcadores genéticos comumente alterados na dermatite atópica.....	113
5. DISCUSSÃO	115
6. CONCLUSÃO.....	119
REFERÊNCIAS	120
CAPÍTULO 4 – Epiderme humana reconstruída (RHE) como plataforma de testes para avaliação de fotoimunossupressão.....	125
1. INTRODUÇÃO.....	126
1.1. Radiação Ultravioleta.....	126
1.1.1. Radiação Ultravioleta e Imunossupressão.....	128
2 OBJETIVOS.....	134
2.1 Objetivo geral.....	134
2.2 Objetivos específicos	134
3. METODOLOGIA.....	135
3.1. Radiações e equipamento utilizados	135
3.2. Avaliação da viabilidade da epiderme humana reconstruída (RHE) após exposição à radiação que mimetiza o sol do meio-dia, radiação UVB e radiação UVA....	135
3.3. Exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a substâncias sabidamente alergênicas e RUV	135
3.4. Análise Estatística	136
4. RESULTADOS	137
4.1. Avaliação da viabilidade do RHE após exposição à radiação UV (RUV)	137
4.2. Viabilidade celular da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) após exposição a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV).....	139
4.3. Avaliação da anulação da hipersensibilidade de contato após exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV).....	140

4.4. Avaliação da liberação da interleucina imunossupressora IL-10 e dano oxidativos ao DNA do tipo 8-Oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) após exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV)	141
5. DISCUSSÃO	143
6. CONCLUSÃO	146
REFERÊNCIAS	147
ANEXOS	151
APÊNDICE	158

CAPÍTULO I - Desenvolvimento da epiderme humana reconstruída (RHE)
e seu uso para ensaios para avaliação de irritação cutânea *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Métodos alternativos ao uso de animais

Atualmente, diversos ensaios empregando animais ainda são utilizados para avaliação de efeitos imunotóxicos como imunossupressão e sensibilização. No entanto, esses ensaios lidam com diversas questões secundárias como, custos, questões éticas e relevância para a avaliação de risco humano. Somado a isso, há uma ideia crescente de que abordagens *in vitro* podem eliminar esses problemas sem prejuízos à segurança humana, desde que marcadores biológicos estejam disponíveis para identificar o potencial imunotóxico de novos produtos químicos aos quais os seres humanos possam ser expostos (CORSINI; ROGGEN, 2009).

Tanto as indústrias farmacêuticas quanto as indústrias químicas têm interesse em utilizar modelos alternativos e testes *in vitro* para ensaios de segurança. Considerando-se que de 5.000 a 10.000 moléculas em processo de triagem de um novo fármaco, apenas uma é finalmente aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) a um custo de mais de um bilhão de dólares, grande parte desse custo devido a testes em animais (LEE et al., 2012).

Em 1986, a Diretriz 86/609 da Comunidade Econômica Europeia (European Commission, 1986) banizou os testes em animais quando uma alternativa cientificamente comprovada existisse, e, desde 2013, na UE a comercialização de cosméticos contendo substâncias testadas *in vivo* para qualquer efeito independentemente da disponibilidade de alternativas aos testes em animais está proibida (Emenda 2003/15/EC da diretiva 76/768 EEC). O processo visando a proibição do uso de animais para fins cosméticos na UE durou vinte anos e contou com grandes investimentos em pesquisa científica (**Figura 1**).

Além da comunidade Europeia, outros países como Israel, Noruega e Índia já não permitem testes de cosméticos em animais (LEE, 2016). No cenário brasileiro, ainda não é possível banir a utilização de animais na avaliação de segurança de produtos cosméticos, apesar disso, essa prática deverá ser implementada rapidamente em nosso país para que atenda aos conceitos humanitários internacionais, agregando valor ao produto de exportação das indústrias cosméticas e farmacêuticas brasileiras. Para tanto, faz-se necessária uma sistematização metodológica visando gerar uma plataforma de testes em modelos de pele e epiderme equivalente, que validados, atendam as demandas das indústrias cosméticas e farmacêuticas.

Figura 1 – Linha do tempo dos eventos ocorridos na União Europeia (UE) até a proibição completa do uso de animais para fins cosméticos em março de 2013.
Fonte: Adaptado de *European Commission* (2012).

Na tentativa de contrapor essa problemática, a Resolução Normativa Nº18/2014 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) passou a reconhecer dezessete métodos alternativos ao uso de animais validados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês The Organisation for Economic Co-operation and Development) e, estabeleceu o prazo de até cinco anos (2019) como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo nas instituições de ensino e pesquisa. Dos vinte e três guias reconhecidos no Brasil (**Tabela 1**) dois, OECD 431 e OECD 439, utilizam epiderme humana reconstruída (RHE) (BRASIL, 2014; 2016) no entanto, estes modelos validados são apenas produzidos no exterior e de difícil acesso no nosso país devido a questões logísticas e alfandegárias (DE WEVER et al., 2015a). Outro problema com relação ao uso de modelos validados é que estes são vendidos na forma de kits que se prestam a ensaios específicos, não permitindo assim, o acompanhamento para avaliação de mudanças morfológicas e moleculares, por exemplo (POUMAY et al., 2007; FRANKART et al., 2012). A **Figura 2** resume os eventos e investimentos que ocorreram até o momento no Brasil visando a proibição do uso de animais.

Nesse contexto, nosso grupo vem desenvolvendo alternativas promissoras para a substituição de testes em animais. A utilização da pele humana reconstruída desenvolvida em nosso laboratório deverá certamente contribuir para o desenvolvimento tecnológico no país (FAPESP, 2014; 2016). Seguindo a tendência mundial, nosso laboratório tem se dedicado ao desenvolvimento do modelo de pele humana reconstruída nos últimos dez anos (BROHEM et al., 2011; CARDEAL et al., 2012; PENNACCHI et al., 2015a) e o momento sociopolítico atual exige que essa prática seja implementada rapidamente.

Tabela 1 – Métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos no Brasil

Ensaio
- Potencial de irritação e corrosão da pele
1) OECD TG 430 – corrosão dérmica <i>in vitro</i> : teste de resistência elétrica transcutânea
2) OECD TG 431 – corrosão dérmica <i>in vitro</i> : teste da epiderme humana reconstituída
3) OECD TG 435 – teste de barreira de membrana <i>in vitro</i>
4) OECD TG 439 – teste de irritação cutânea <i>in vitro</i>
- Potencial de irritação e corrosão ocular
5) OECD TG 437 – teste de permeabilidade e opacidade de córnea bovina
6) OECD TG 438 – teste de olho isolado de galinha
7) OECD TG 460 – teste de permeação de fluoresceína
- Potencial de fototoxicidade
8) OECD TG 432 – teste de fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU
- Absorção cutânea
9) OECD TG 428 – método <i>in vitro</i> de absorção cutânea
- Potencial de sensibilização cutânea
10) OECD TG 429 – sensibilização cutânea: ensaio do linfonodo local
11) OECD TG 442A – versão não radioativa do ensaio do linfonodo local
12) OECD TG 442B – versão não radioativa do ensaio do linfonodo local
- Toxicidade aguda
13) OECD TG 420 – toxicidade aguda oral: procedimento de doses fixas
14) OECD TG 423 – toxicidade aguda oral: classe tóxica aguda
15) OECD TG 425 – toxicidade aguda oral: procedimento "up and down"
16) OECD TG 129 – estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica
- Genotoxicidade aguda
17) OECD TG 487 – teste do micronúcleo em célula de mamífero <i>in vitro</i>
- Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular
18) OECD TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares
19) OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído
- Avaliação do potencial de sensibilização cutânea
20) OECD TG 442C - Sensibilização cutânea <i>in chemico</i>
21) OECD TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i>
- Avaliação de toxicidade reprodutiva
22) OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento;
23) OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva
- Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis
24) Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)

Fonte: BRASIL, 2014 e BRASIL, 2016.

Figura 2 – Histórico brasileiro de eventos visando a proibição de testes em animais.

Fonte: Adaptado de Brasil (2014; 2016), Júnior (2013) e Arraes (2016).

1.1. Desenvolvimento de Equivalentes de Epiderme visando seu uso como método alternativo ao uso de animais

A pele é a principal interface entre o corpo humano e o meio ambiente, sendo por isso, facilmente exposta a produtos químicos. No mundo industrializado, os efeitos prejudiciais a pele são uma grande preocupação para a segurança no trabalho e dos consumidores. Consequentemente, os legisladores e os reguladores atribuem alta prioridade à identificação de substâncias químicas que possuam potencial de corrosão ou irritação da pele (WORTH et al., 2014). Essa identificação é necessária também para atender a regulamentação relativa à classificação e rotulagem de substâncias (HOFFMANN et al., 2005).

O desenvolvimento e validação de métodos alternativos à experimentação animal tem sido uma das principais prioridades para a indústria cosmética. Entre os métodos alternativos propostos recentemente, aqueles que usam kits de epiderme humana reconstruída (RHE) constituem a abordagem mais promissora para esta finalidade, uma vez que esses modelos, além de mimetizar o local de aplicação do produto, permitem a aplicação tópica e a avaliação de algumas reações clínicas (ROGUET et al., 2000), além de superar problemas com solubilidade e estabilidade química em solução aquosa, principais limitações de muitos métodos *in vitro* baseados na utilização de culturas submersas (GIBBS et al., 2013).

Assim, para o sucesso de um modelo *in vitro*, este deve ser altamente confiável tanto em matéria de classificação das substâncias quanto na reprodutibilidade e relevância dos resultados (HOFFMANN et al., 2005; ROGUET et al., 2000). A disponibilidade imediata do modelo deve ser garantida por meio da produção em larga escala e em uma instalação local para evitar problemas logísticos, além disso, ele deve ser econômico, pois é necessário para testes de rotina (HOFFMANN et al., 2005).

A disponibilidade de RHEs representa uma melhoria significativa em relação a utilização de culturas em monocamada (LEMPER; DE PAEPE; ROGIERS, 2014). Tais modelos têm sido utilizados para estudos de metabolismo de produtos farmacêuticos, determinação das propriedades de absorção, avaliação da irritação cutânea ou fototoxicidade, e para estudos de respostas da epiderme a substâncias irritantes e sensibilizantes (POUMAY et al., 2004). As culturas de células em monocamada e RHEs não são apenas uma alternativa a oferta da experimentação animal e uma forma de atender às exigências das autoridades regulatórias, organizações de bem-estar animal, consumidores e cientistas, mas também

proporcionam um meio de melhorar e alargar o nosso conhecimento dos processos biológicos da pele (ABDEL-NASER et al., 2005).

Em equivalentes de pele, os queratinócitos epidérmicos crescem em interface ar-líquido exposta ao ar sobre uma matriz de colágeno do tipo I em que fibroblastos e possivelmente outras células são incorporadas, dando origem a tecidos de arquitetura quase normal (ABDEL-NASER et al., 2005). Entretanto, quando um modelo de RHE *in house* está sendo desenvolvido, os pesquisadores podem encontrar algumas dificuldades durante o cultivo. Assim, questões importantes que incluem a densidade celular, o uso de enzimas, meios de cultura, armazenamento e viabilidade celular, confluência celular e extração de proteínas são questões que devem ser controladas em termos de tempo, concentração e volume (LEMPER; DE PAEPE; ROGIERS, 2014). O desenvolvimento de RHEs *in house* tem sido um grande desafio para diversos pesquisadores (LEMPER; DE PAEPE; ROGIERS, 2014) e foi o primeiro grande desafio desta tese.

Apesar da utilidade de equivalentes de pele para a clínica e para a pesquisa, não há nenhuma formulação consistente para meios de culturas organotípicas. Geralmente, tais meios de cultura requerem suplementação com numerosos aditivos, incluindo soro, vitaminas, minerais, hormônios e fatores de crescimento (**Tabela 2**) (NG et al., 2011). O número de suplementos pode chegar a cerca de 14 a 16 componentes individuais, fazendo da preparação do meio um processo potencialmente trabalhoso que também está sujeito a preferências e escolhas laboratoriais individuais, resultando em variações na composição dos meios que podem ser difíceis de reproduzir (NG et al., 2011).

Tabela 2 – Fatores de crescimento comumente utilizados para o desenvolvimento de equivalentes de pele e de epiderme

Classificação	Substâncias	Função	Referências
Hormônios e proteínas	<i>Epidermal growth factor</i> (EGF)	Mitógeno para a maioria dos tecidos. Acelera a migração dos queratinócitos ao invés da proliferação e induz a contração. Auxilia na adesão de queratinócitos ao plástico e componentes da membrana (ex.: colágeno IV)	(HASSKARL; VELUPILLAI; MÜNGER, 2006; WOODLEY; WYNN; O'KEEFE, 1990)
	<i>Transforming growth factor-α</i> (TGF-α)	Possui papel similar ao do EGF, entretanto é um mitógeno mais potente	(ABDEL-NASER et al., 2005)
	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	Estimula a migração dos queratinócitos	(SCHULTZ; WYSOCKI, 2009)

	<i>Keratinocyte Growth Factor</i> (KGF)	Promove a proliferação e diferenciação de células epiteliais	(KORIA; ANDREADIS, 2007)
	Insulina	Envolvida no metabolismo lipídico e da glicose, captação de aminoácidos, síntese de DNA; regula a expressão do receptor de VEGF	(BAE; PARK; KIM, 2014; KEENAN; PEARSON; CLYNES, 2006)
	Transferrina	Transportadora de ferro; auxilia na redução dos níveis tóxicos de ROS (espécies reativas de oxigênio), que podem ser gerados pelo ferro proteico não- ligado.	(KEENAN et al., 2006; MAINZER et al., 2014; TAKAGI et al., 2011)
	Hidrocortisona	Promove a proliferação de queratinócitos	(TAKAGI et al., 2011)
Íons	Cálcio	Importante para a formação de junções celulares e desmossomos. Em concentrações elevadas, inibe a proliferação de queratinócitos e induz a estratificação epitelial.	(ITO et al., 2011; KOIZUMI et al., 1991; LAMB; AMBLER, 2013; SIVAMANI; LAM; ISSEROFF, 2007)
Substratos	Filme de colágeno	Melhora a adesão celular; afeta a propagação; melhora a eficiência de plaqueamento; inibe o crescimento de fibroblastos; promove a formação de hemidesmossomos e laminina basal; melhora a organização tecidual e aumenta a homogeneidade de diferenciação na cultura de células	(HOLBROOK; HENNINGS, 1983b)
AMPc ou modificadores dos níveis de AMPc	Toxina colérica	Promovem o crescimento e aumentam o tamanho das colônias; induzem a diferenciação; níveis aumentados podem ter um efeito "qualitativo" na diferenciação	(HOLBROOK; HENNINGS, 1983b)
	Isoproterenol		
Meios	Meio condicionado de fibroblastos	Fatores solúveis secretados pelos fibroblastos em meio de cultura são suficientes para a indução da proliferação e diferenciação de queratinócitos	(EL GHALBZOURI; PONEC, 2004; WONG; MCGRATH; NAVSARIA, 2007)
Vitaminas	Ácido ascórbico (vitamina C)	Promove a secreção e organização lipídica da matriz extracelular (ECM) do estrato córneo e melhora a função de barreira da epiderme	(AUXENFANS et al., 2009; PASONEN-SEPPÄNEN et al., 2001)
Soro	Soro fetal bovino (FBS)	Estimula a diferenciação de células e estratificação	(LAMB; AMBLER, 2013)
Condições de cultivo	Interface ar-líquido	Promove a síntese de profilagrina e o fenótipo granular com o desenvolvimento de grânulos de querato-hialina que são características de diferenciação de queratinócitos	(PRUNIÉRAS; RÉGNIER; WOODLEY, 1983)
	Redução da humidade	Favorece um gradiente de íons normal e induz a formação de um estrato córneo mais coeso e uniforme	(MAK et al., 1991; NOLTE et al., 1993; SUN et al., 2015)

Rheinwald and Green, em 1975, descreveram um meio para cultivo de queratinócitos (RGM) e desde então, meios de cultura modificados do RGM originalmente descrito ainda são amplamente utilizados (LAMB; AMBLER, 2013). Rheinwald e Green (1975) foram os primeiros a demonstrar que os queratinócitos podem crescer e formar colônias estratificadas, mas ainda não conseguiam alcançar um programa de diferenciação normal. Tempos depois, Prunieras et al. (1983) demonstraram que a exposição destas células a uma interface ar-líquido permitia o desenvolvimento de uma epiderme completamente diferenciada (FRANKART et al., 2012).

Alguns modelos de RHE encontram-se comercialmente disponíveis, entretanto, para laboratórios e indústrias de cosméticos em países em desenvolvimento como o Brasil, onde os problemas aduaneiros muitas vezes impedem a importação de kits comerciais, a disponibilidade de um protocolo *open-source* que possa ser utilizado para ensaios toxicológicos é crítica (DE WEVER et al., 2015b). Assim, há a necessidade de protocolos que permitam o desenvolvimento de um modelo RHE *in house*, a fim de ultrapassar o elevado custo dos kits comerciais e permitir o acesso a essa tecnologia (DE VUYST et al., 2014; POUMAY et al., 2004; POUMAY; COQUETTE, 2007).

Nesse contexto, a OECD incentiva a produção de novos modelos de RHE, proporcionando uma orientação detalhada em seu guia OECD N.º 439 acerca dos parâmetros de controle de qualidade e desempenho que o modelo deve apresentar. Tais parâmetros incluem critérios padronizados para viabilidade celular, função barreira, morfologia e reprodutibilidade (JUNG et al., 2014). Assim, este trabalho voltou-se para o desenvolvimento de um modelo RHE (aqui denominado como USP-RHE), usando o RGM com modificações.

1.3. Avaliação de irritação cutânea *in vitro*

Queratinócitos desempenham um importante papel na iniciação, regulação e modulação da inflamação (COQUETTE et al., 1999). Dentre os casos de reações inflamatórias cutâneas, a irritação é um dos efeitos adversos mais comuns, representando 70 % de todos os casos de dermatite de contato (GOH; SOH, 1984).

Irritação cutânea é uma reação inflamatória não-imunogênica que surge após o estímulo e desaparece após alguns dias (WELSS; BASKETTER; SCHRÖDER, 2004). É um processo

reversível que se desenvolve após a aplicação de uma substância por até quatro horas (OECD, 2015d). O termo clínico para a irritação da pele, tal como observado em seres humanos, é Dermatite de contato irritativa (DCI). A DCI, depois de doenças musculoesqueléticas, é a doença profissional mais comum, entretanto, não há evidências que a DCI, pelo menos no local do trabalho, possua uma incidência maior que a Dermatite de contato alérgica (DCA), resultante de sensibilização da pele (WORTH et al., 2014).

A avaliação de irritação cutânea é tradicionalmente realizada em animais por meio de avaliação de mudanças visíveis como eritema e edema, em um ensaio denominado teste de Draize, o qual representa potencial dor e desconforto ao animal além de apresentarem resultados nem sempre preditivos em relação ao que ocorre em humanos. Assim, a utilização de ensaios *in vitro* como o da epiderme humana reconstruída apresentam-se cada vez mais favorecidos, principalmente devido a sua semelhança com a epiderme humana (WELSS; BASKETTER; SCHRÖDER, 2004)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver um protocolo “open source” de epiderme humana reconstruída que atenda aos parâmetros internacionais de qualidade exigidos e que seja capaz de distinguir entre agentes irritantes e não irritantes de acordo com o guia OECD 439.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade dos queratinócitos humanos primários disponíveis quanto aos parâmetros de diferenciação;
- Gerar epidermes humanas reconstruídas (RHEs) diferenciadas sobre membranas *transwell*[®];
- Avaliar histologicamente a diferenciação epidérmica e qualidade do RHE;
- Avaliar a função barreira do RHE gerado;
- Avaliar os parâmetros de viabilidade celular do RHE gerado;
- Avaliar a capacidade do modelo de distinguir entre agentes irritantes e não irritantes de acordo com o guia OECD 439.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção de células primárias humanas

Para obtenção de cultura primária das células da pele (queratinócitos, melanócitos e fibroblastos), amostras de pele de prepúcio foram doadas por pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) por meio pela Dra. Linda Maximiano. Para tanto, o projeto "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos" sob coordenação da Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, passou por apreciação e aprovação dos Comitês de Ética do Hospital Universitário (Processo no. CEP HU 943/09 – ANEXO) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Processo no. CEP/FCF/534 - ANEXO) da Universidade de São Paulo.

No dia do recebimento da amostra de pele realizou-se uma lavagem do tecido em etanol 70 % e em solução de tampão fosfato salina (PBS) estéril. Logo após, o tecido foi colocado em uma placa de Petri com 1 mL da Solução A (22,5 mM HEPES, 7,6mM Glicose, 2,25 mM KCl, 100mM NaCl, 0,75 mM Na₂HPO₄; pH7,4). Desse tecido, retirou-se o tecido adiposo e vasos sanguíneos presentes e, então a amostra foi cortada em fragmentos de 3x3 mm, e foram adicionados 5 mL da Solução A contendo dispase. Após 18h de incubação a temperatura ambiente, a derme e epiderme foram separadas com auxílio de pinças. A epiderme foi colocada em um tubo contendo meio específico para queratinócitos (KGM-Gold – Lonza) e então centrifugada por 3 minutos a 2000 rpm e replaqueada em placa de petri contendo meio de queratinócitos. Após 24 h o meio foi substituído. Acompanhou-se o crescimento das células provenientes da epiderme ao longo dos dias e, quando a confluência foi atingida, iniciou-se o processo de separação das células (melanócitos e queratinócitos) por meio de tripsinização, uma vez que os melanócitos possuem uma aderência à placa e às células muito menor que os queratinócitos. Após uma ou duas passagens, as culturas estavam “puras”, ou seja, não contaminadas com outros tipos celulares.

A derme foi colocada em solução de collagenase tipo I (1 mg/mL) por 4 horas a 37 °C. Após esse período, adicionou-se 1mL de Soro Fetal Bovino (SFB), inativando a enzima, e a derme foi centrifugada (3 minutos a 2000 rpm). O tecido foi, então, ressuspensão e colocado em placa de petri contendo 10 mL de meio DMEM suplementado com 10 % SFB e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Após 24 h o meio foi substituído.

Acompanhou-se a cultura dos fibroblastos, até a obtenção de uma placa com aproximadamente 90 % de confluência (3-4 dias).

3.2. Controle de qualidade de células primárias humanas

A avaliação de contaminantes nas culturas primárias de queratinócitos, fibroblastos e melanócitos de pele humana isolados no Laboratório de Citopatologia FCF-USP foi realizada em parceria com a equipe liderada pela Profa. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro no laboratório de Citologia Clínica e Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), PR, conforme protocolo padronizado pelo grupo (GIMENES et al., 2014). O DNA e RNA (cDNA) foram extraídos em nosso laboratório e então preparados para o envio.

Em suma, todas as culturas primárias utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto a presença de *Treponema pallidum*, *Herpes virus simplex* (HSV-1) e HSV-2, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HPV e *Mycoplasma sp.* Para a detecção simultânea desses agentes utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex.

A técnica de PCR voltada para o diagnóstico molecular permite seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (Molina; Tobo, 2004) e foi utilizada para a detecção de HPV e *Mycoplasma sp.* Para a detecção de HIV (vírus da imunodeficiência humana), CMV (Citomegalovírus), HBV (vírus da hepatite B) e HCV (vírus da hepatite C), utilizou-se a técnica de rt-PCR.

3.3. Geração da epiderme humana reconstruída (RHE)

Queratinócitos humanos isolados de prepúcio foram mantidos em cultura utilizando meio comercial específico para crescimento desse tipo celular (KGM™Gold e KGM single kit Lonza®), em estufa a 37 °C com 7,5 % de CO₂ para manutenção do pH ideal. Os queratinócitos primários com 70 % de confluência foram utilizados para a reconstrução da epiderme da seguinte forma: 25x10⁴ queratinócitos foram plaqueados em placa de 12 poços contendo

transwell com membrana de poro 0,4 μm . As células foram mantidas por 24 horas submersas nos meios KGMTM/RAFT na proporção 1:1. Após o período de adesão, cada *transwell* foi transferido para um sistema “*deepwell*” em uma interface ar-líquido (meio RAFT: DMEM:HAM 3:1 contendo insulina 5 $\mu\text{g/mL}$, hidrocortisona 0,4 $\mu\text{g/mL}$, apotransferrina 5 $\mu\text{g/mL}$, toxina colérica 1 nM, EGF 2 ng/mL, TGF- α 2 ng/mL e meio condicionado de fibroblastos 5 %) mantida por 11 dias para diferenciação da epiderme em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂ (modificado de Brohem et al., 2011).

3.4. Controle de qualidade do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE)

3.4.1. Morfologia e imunohistoquímica

Amostras de RHE foram fixadas em formol a 10%, a 4 °C, desidratados e embebidos em parafina. As lâminas contendo corte de 6 μm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação morfológica. Para análise imunohistoquímica (IHC), a recuperação antigênica foi realizada duas vezes em tampão citrato de pH 6,0 durante 5 min a 95 °C. As amostras foram incubadas com anticorpos primários para citoqueratina 10 (CK10 - 1: 300) ou citoqueratina 14 (CK14 - 1: 300) (Abcam-1421 e Abcam-7800, Abcam Cambridge, Reino Unido) *overnight* a 4 °C em câmara úmida, e subsequentemente incubadas durante 1 h a temperatura ambiente com anticorpos secundários espécie-específicos. Todas as imagens foram obtidas por microscopia óptica e analisadas por software NIS Elements (Nikon Instruments, Melville, NY) (PENNACCHI et al., 2015).

3.4.2. Viabilidade celular do controle negativo

O ensaio de viabilidade celular para o controle negativo foi realizado de acordo com o guia OECD 439 utilizando o ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo). Os tecidos foram expostos ao tampão fosfato-salina (PBS), lavadas com PBS, e incubadas com 300 μL de MTT (1 mg/mL) a 37 °C em incubadora de CO₂ a 5%. Após 3 h de incubação o excesso de MTT foi removido e o tecido foi lavado com PBS. Os sais de formazan reduzido foram extraídos por incubação com 2 mL de isopropanol durante 2 h. Subsequentemente, 200 μL da solução de extração, foram transferidos para uma placa de 96 poços, e a densidade óptica (DO) do corante púrpura resultante foi mensurada em 570 nm utilizando-se um leitor de placas de ELISA (BioTek Instruments INC., Winooski, VT, EUA).

3.4.3. Avaliação da função barreira do RHE - Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50)

Avaliação da integridade dos tecidos e da função de barreira do RHE foi realizada avaliando-se o tempo de exposição necessário para uma substância química de referência citotóxica levava para reduzir a viabilidade celular em 50% (ET50 – *exposure time* 50) e a concentração capaz de reduzir a viabilidade do RHE em 50% (EC50 – *exposure concentration* 50), de acordo com o guia OECD 439. Para avaliação DA ET50, os tecidos foram expostos a 1% de Triton X-100 por 0, 4, 8, 12 e 16 h; para avaliação de EC50, os tecidos foram expostos ao dodecil sulfato de sódio (SDS) durante 18 h em diferentes concentrações (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5 mg/mL). A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT, como descrito acima.

3.5. Aplicabilidade do protocolo USP-RHE para ensaios de avaliação de irritação cutânea *in vitro*

Para avaliar a aplicabilidade do modelo de RHE desenvolvido (aqui denominado como USP-RHE) para avaliação de irritação cutânea *in vitro*, utilizou-se o protocolo utilizado para o modelo EpiSkin™ (OECD 439) com pequenas modificações. Segundo este ensaio, o equivalente de epiderme deve ser capaz de distinguir entre irritantes e potencialmente não irritantes. A substância a ser testada é aplicada topicamente na epiderme reconstruída por 15 minutos. O princípio do método baseia-se na premissa de que os produtos químicos irritantes são capazes de penetrar o estrato córneo por difusão ou erosão, e são citotóxicos para as células subjacentes, caracterizando um dano reversível que é avaliado pela técnica do MTT após 42 h de incubação. Produtos químicos irritantes são identificados pela sua capacidade de diminuir a viabilidade celular abaixo dos níveis de limiar definidos (isto é, $\leq 50\%$).

Após 2 horas de pré-incubação, os tecidos foram removidos da incubadora e imediatamente expostos a substâncias irritantes e não irritantes. Os tecidos foram expostos a 29 μL , quando substâncias líquidas, ou 30 mg, quando sólidos, aplicadas diretamente na superfície do tecido. A aplicação de materiais sólidos foi precedida por 29 μL de água destilada aplicada diretamente sobre o inserto. SDS a 5 % em PBS foi usado como controle positivo. Após 15 min de exposição às substâncias testes, os tecidos foram lavados com PBS e mantidos na incubadora por mais 42 h. Após este período, os tecidos foram transferidos para placas de 24 poços e

incubados com MTT (1 mg/mL) por 3 h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os tecidos foram novamente lavados com PBS e transferidos para uma nova placa contendo 2 mL de isopropanol para a extração do formazan reduzido, onde permaneceram à temperatura ambiente por 2 h. Após esse período, coletou-se 200 µL da solução de extração e transferiu-se para placa de 96 poços. A densidade óptica do corante púrpura resultante foi medida a 570 nm utilizando um leitor de placas de ELISA. O isopropanol foi usado como “branco” (OECD, 2015c).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de células para cultura primária

Para a realização deste trabalho, fez-se necessária a obtenção de cultura primária das células da pele (queratinócitos, melanócitos e fibroblastos) obtidas a partir de tecidos de pele de prepúcio doados por pacientes do Hospital das Clínicas e Hospital Universitário. Durante o período de realização deste trabalho só foram utilizadas células que apresentaram resultados negativos para a presença de microrganismos durante o controle de qualidade biológico descrito no item 4.1.1.

4.1.1. Controle de qualidade das culturas primárias

Todas as culturas de queratinócitos primários utilizadas neste trabalho encontravam-se livres de contaminação pelos microrganismos estudados descritos na legenda da **figura 3**. A **tabela 3** traz resultados sobre a presença ou não de microrganismos nas amostras de queratinócitos analisadas.

Figura 3 – Representação dos ensaios para determinação de contaminantes.

A. Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para detecção de HPV por PCR em gel de agarose 1,5 %. M – Marcador de 100pb. CP – Controle positivo; CN HPV – Controle negativo de HPV; CN B-gl – Controle negativo B-globina; Abaixo de cada amostra (71, 77 e 88) está HPV para análises para Papiloma vírus humano e B-gl para análise de B-globina. B. Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para sete microrganismos usando PCR multiplex em gel de poliácridamida 8 %. *Chlamydia trachomatis* (C1), *Treponema pallidum* (C2), *Herpes virus simplex* (HSV-1) (C7) e HSV-2 (C3), *Mycoplasma genitalium* (C4), *Trichomonas vaginalis* (C5), *Neisseria gonorrhoeae* (C6). Todas as amostras encontravam-se livres de contaminação viral.

Fonte: Laboratório de Citologia Clínica e DSTs– UEM.

Tabela 3 – Avaliação de microrganismos na cultura primária e perfil dos pacientes.

Paciente	Idade	Cor/ Raça	HPV	C2-C7	HIV, HCV, HBV e CMV	Mycoplasma sp.
# 71	6	Branco	N	N	N	N
# 77	35	Negro	N	N	N	N
# 78	11	Negro	N	N	N	N
# 79	11	Pardo	N	N	N	N
# 80	5	Negro	N	N	N	N
# 81	9	Negro	N	N	N	N
# 86	6,2	Pardo	N	N	N	N
# 87	39	Branco	N	N	N	N
# 88	16	Pardo	N	N	N	N
# 89	7	Negro	N	N	N	N

HPV – Papiloma vírus humano;

C2-C7 – Microrganismos analisados: *Treponema pallidum*, *Herpes virus simplex 1* (HSV-1), *Herpes virus simplex 2* (HSV-2), *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, e, *Neisseria gonorrhoeae*; HIV (vírus da imunodeficiência humana), CMV (Citomegalovírus), HBV (vírus da hepatite B) e HCV (vírus da hepatite C),

N – Negativo;

4.2. Geração da epiderme humana reconstruída (RHE)

Visando a obtenção da epiderme humana reconstruída (RHE), primeiramente foram plaqueados queratinócitos sobre a membrana *transwell* mantendo-os em interface ar-líquido por 11 dias com meio de cultivo desenvolvido em nosso laboratório para cultivo de pele *in vitro* (PENNACCHI et al., 2015); este meio possui diversos fatores de crescimento como *epidermal growth factor* (EGF), insulina, hidrocortisona, apo-transferrina e toxina colérica. Entretanto, não obtivemos diferenciação epidérmica satisfatória dos RHEs utilizando tal meio. Tal resultado ocorreu devido a ausência do compartimento dérmico, como ocorre no cultivo dos equivalentes de peles *in vitro*, isso porque a derme possui uma matriz de colágeno do tipo I e fibroblastos, a qual fornece um microambiente ideal e fatores de crescimento secretados por fibroblastos que atuam diretamente na diferenciação epidérmica.

Assim, após diversas tentativas de alteração do meio de cultivo, manejo celular e extensa revisão da literatura, padronizamos as condições ideais para a obtenção de uma epiderme diferenciada sobre membrana *transwell*.

Os fatores de crescimento descritos na **Tabela 2** (ver Introdução) foram estudados isoladamente ou em conjunto, e a cada nova bateria de ensaios eles eram combinados ou

retirados do protocolo de desenvolvimento do RHE. A **figura 4** ilustra alguns dos progressos obtidos durante esse período.

Figura 4 – Padronização da diferenciação epidérmica sobre membrana *transwell*.

Todas as condições apresentadas foram tratadas com meio de cultivo preparado no laboratório conforme descrito por Brohem et al. (2012) nas seguintes condições: a. Controle (Apenas meio de cultivo de pele (RAFT)); b. Filme de colágeno IV sobre o *transwell*; c. Filme de colágeno IV sobre o *transwell* e acréscimo de meio condicionado de fibroblastos a 5 % (MC 5 %) ao meio RAFT; d. Acréscimo de MC 5 % ao meio de cultivo; e. Acréscimo de TGF- α ao meio RAFT; f. Acréscimo de TGF- α e MC 5 % ao meio de cultivo; g. Filme de colágeno IV sobre o *transwell*, acréscimo de TGF- α e MC 5 % ao meio de cultivo; h. Filme de colágeno I (80 μ L a 200 μ g/mL) sobre o *transwell*. i. Filme de colágeno IV sobre o *transwell* com apenas 5 % de soro fetal bovino (SFB 5 %) e acréscimo de ácido linoleico, TGF- α e MC 5 %. j. Filme de colágeno IV sobre o *transwell* sem SFB e acréscimo de TGF- α e MC 5 %; k. Filme de colágeno I (800 μ L a 2,5 mg/mL) com meio RAFT de pele; l. Filme de colágeno IV sobre o *transwell* sem SFB e acréscimo de TGF- α e MC 5 % em estufa semi-seca nos três últimos dias de cultivo; Aumento: 20 X (bar= 200 μ m).

Após a combinação de revestimento de colágeno IV sobre a membrana *transwell*, adição de TGF- α e meio condicionado de fibroblastos ao meio de cultivo da epiderme humana reconstruída (RHE) obtivemos uma epiderme diferenciada, porém ainda não totalmente satisfatória (**Figura 4G**) se comparada aos modelos internacionais disponíveis comercialmente. Em **4G** podemos observar a epiderme bem diferenciada, mostrando uma camada córnea abundante e, uma camada basal que neste aumento não pode ser visualizada.

Nas **figuras 4H e 4K** estão figuras representativas das diversas baterias visando avaliar a influência do colágeno I no desenvolvimento epidérmico. Em **4H** fez-se um filme fino com

colágeno I (80 μ L aplicado sobre o *transwell*) em baixa concentração (200 μ g/mL) onde nota-se um pequeno estrato córneo, no entanto, baixo desenvolvimento das camadas intermediárias. Em **4K**, fez-se um filme de colágeno a 2,5 mg/mL sem fibroblastos, mas com procedimento totalmente semelhante ao que utilizamos para desenvolvimento de equivalente de pele conforme protocolo e meios descritos por Brohem et al. (2011), pode-se notar portanto em **4K**, o desenvolvimento da epiderme mais próximo do esperado, entretanto, com as camadas intermediárias comprometidas. Um problema que nos fez optar apenas pelo colágeno IV, foi a falta de reprodutibilidade e de qualidade das epidermes geradas sobre colágeno I principalmente devido a contração do colágeno I.

A influência do cálcio, do tyron (um antioxidante) e a influência do tempo submerso em meio RAFT e meio de queratinócitos em diversas condições também foram estudados, mas não estão ilustrados por não demonstrarem melhorias significativas no desenvolvimento epidérmico. Quando comparamos se a quantidade de células plaqueadas sobre o transwell (25 x 10⁴ células/mL ou 50 x 10⁴ células/mL) por exemplo, melhorariam o desenvolvimento epidérmico na melhor condição obtida até aquele momento (**Figura 4F**) notamos que não houve influência significativa.

Após nova busca na literatura verificamos que o tempo de cultivo em interface ar-líquido usado por empresas como ZENBIO, HENKEL e L'Oréal eram sempre superiores a quinze dias. Avaliamos então, se o tempo de manutenção da interface ar-líquido poderia influenciar no desenvolvimento da camada córnea melhorando a diferenciação epidérmica. Além disso, também foram avaliadas novas condições, como a influência da adição de ácido linoleico (**Figura 4I**), da retirada ou diminuição da quantidade de soro fetal bovino no meio de cultivo (**Figura 4J e 4L**), e o cultivo em estufa semi-seca, ou seja, com umidade reduzida, durante os últimos dias de desenvolvimento epidérmico visando a obtenção de um modelo competitivo em relação aos modelos validados (**Figura 4L**).

Dentre todas as condições testadas nesta fase, a condição que somava a retirada de soro fetal bovino do meio de cultivo e a incubação em estufa semi-seca nos três últimos dias de interface ar-líquido (num total de 12 dias) foram as que nos forneceram a epiderme reconstruída ideal, bem diferenciada e visualmente competitiva quando comparada com os modelos internacionais validados (**Figura 4I**).

O epitélio obtido após as melhorias de protocolo (**Figura 4I**) mostra-se semelhante à epiderme humana quanto a diferenciação e estratificação epitelial e está dentro do que é preconizado para equivalentes de epiderme, que prevê a presença de doze a quinze camadas celulares bem desenvolvidas, com prevalência de uma camada córnea bem pronunciada.

A **Figura 5** apresenta um comparativo entre o nosso modelo, a epiderme humana e os modelos validados descritos no guia OECD 439.

Observa-se na **Figura 5** a semelhança do epitélio reconstruído por nosso grupo com os equivalentes que foram validados pela OECD para ensaios de irritação (OECD GD 439) e que estão disponíveis comercialmente. Outro aspecto interessante observado em nosso modelo foi o menor tempo necessário ao desenvolvimento do epitélio (11 dias) quando comparado com os modelos EpiDermTM (Mattek) e SkinEthic (L'Oréal) (14 e 17 dias, respectivamente). Um dos modelos validados, EpiSkin (L'Oréal), é desenvolvido em 10 dias, entretanto para a sua confecção faz-se necessário a utilização de um filme de colágeno I e um filme de colágeno IV, o que o torna mais caro que o nosso modelo e de difícil reprodutibilidade.

Figura 5 – Quadro comparativo entre a (a) epiderme humana, (b) nosso modelo de equivalente de epiderme e os modelos validados pelo Guia OECD 439 para ensaios de irritação (c) SkinEthicTM RHE, (d) EpiSkin model, (e) EpiDermTM Tissue Model e (f) LabCyte EPI-MODEL.

Fontes: a. Brohem et al., 2011; b. O autor; c. <http://www.episkin.com/RHE.asp>; d. <http://www.episkin.com/EPISKIN.asp>; e. <http://www.mattek.com/EpiDerm/data-sheet>; f. <http://www.jppte.co.jp/english/business/LabCyte/LabCyte.html>

4.3. Controle de qualidade do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE)

4.3.1. Avaliação histológica e imunohistoquímica

A morfologia é um dos principais parâmetros de controle de qualidade descritos no guia OECD 439. Empregando-se a coloração por hematoxilina e eosina (HE) podemos verificar que o RHE gerado apresenta histologia semelhante à epiderme humana bem como se encontra totalmente diferenciado apresentando camada basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (**Figura 6**).

A fim de avaliar a expressão de proteínas associadas à diferenciação epidérmica na RHE, foi realizado ensaio de imunofluorescência para marcadores de diferenciação epitelial. Duas proteínas associadas à diferenciação da epiderme foram selecionadas, as citoqueratinas 10 e 14. A citoqueratina 10 é expressa abundantemente por queratinócitos nas camadas de estratificação intermediárias, indicando células em processo avançado de maturação. A citoqueratina 14 é expressa majoritariamente por queratinócitos basais indiferenciados e proliferativos, indicando as células de reserva no tecido.

Observa-se na **Figura 6**, a expressão da citoqueratina 10 por toda a extensão epitelial acima da camada basal como esperado, indicando a capacidade de maturação das células neste modelo. Já a citoqueratina 14 mostrou-se abundante na camada basal, e ausente no extrato córneo, indicando o grande potencial proliferativo dos queratinócitos (**Figura 6**).

Figura 6 – A. Coloração diferencial por Hematoxilina e Eosina (HE). B. imunomarcagem para citoqueratina 10 (CK10). C. imunomarcagem para citoqueratina 14 (CK14). Aumento 20X. (bar= 200 µm)

4.3.2. Viabilidade celular do controle negativo

Os tecidos tratados com PBS como controle negativo demonstraram estabilidade em cultura, uma vez que a viabilidade medida pelo ensaio de MTT foi constante ao longo dos ensaios realizados. Para definição da densidade óptica (DO) para o controle negativo avaliou-se o resultado obtido no MTT para uma epiderme onde aplicou-se PBS topicamente. Tais resultados encontram-se em conformidade com o guia OECD TG 439 (**Tabela 4**). O solvente de extração utilizado (isopropanol), apresentou DO suficientemente baixa ($< 0,1$) em todos os testes realizados, enquanto que os tecidos referentes ao controle negativo apresentaram valores de DO dentro da variabilidade inferior e superior aceitável para os modelos de referência validados (VRM) descritos no guia (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Valores de densidade óptica (DO) para o controle negativo em ensaio de MTT para o USP-RHE e os modelos validados e descritos no Guia OECD 439.

Modelo	Menor limite aceitável	Maior limite aceitável
USP-RHE*	≥ 0.6	≤ 1.7
EpiSkin™ (SM) EpiDerm™	≥ 0.6	≤ 1.5
SIT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0.7	≤ 2.5

* Os resultados representam experimentos independentes (n=3) em comparação com o controle ($p < 0,05$).

4.3.3. Avaliação da função barreira do RHE - Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50)

A integridade e a função barreira do nosso modelo foram analisadas pela avaliação da viabilidade do tecido. A integridade do tecido (viabilidade dos queratinócitos) foi medida pelo ensaio de MTT empregando-se a concentração de exposição 50 (EC₅₀) e, o tempo eficaz 50 (ET₅₀). EC₅₀ é definida como a concentração necessária para que o SDS reduza a viabilidade celular em 50%, enquanto que o ET₅₀ é definido como o tempo necessário para que o Triton X-100 a 1% reduza a viabilidade celular em 50% (**Figura 7**).

Figura 7 – Avaliação da integridade da função barreira do equivalente de epiderme.

A. Curva de viabilidade da epiderme humana reconstruída (RHE) após exposição a diferentes concentrações de SDS (0; 0,625; 1,25; 2,5 e 5 mg/mL) por 18 h. B. Viabilidade da epiderme humana reconstruída (RHE) após exposição a Triton X-100 1 % por diferentes períodos (0; 4; 8; 12 e 16 h). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes (n=3) em comparação com o controle. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Quando comparamos o intervalo obtido em nosso modelo e o apresentado pelos modelos validados observamos que o mesmo apresenta-se com função barreira ótima e mais uma vez comparável aos modelos comerciais validados (**Tabela 5**). A EC_{50} obtida variou entre 2,1 a 3,4 mg/mL estando dentro do intervalo apresentado pelos VRMs que vai de 1 a 4 mg/mL. Para a ET_{50} a variação obtida para o USP-RHE foi de 7,7 a 8,9 h enquanto que para os VRMs esse período varia entre 4 a 10 h.

Tabela 5 – Comparação entre a função barreira obtida para o nosso modelo de equivalente de epiderme (USP-RHE)) e os modelos de epidermes validados para ensaios de irritação segundo o guia OECD 439

	EC_{50}	ET_{50}
	SDS (18 h tratamento)	TritonX-100 1%
USP-RHE*	2,1 – 3,4 mg/mL	7,7 – 8,9
EpiSkin™ (SM)	1 – 3 mg/mL	-
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	-	4 – 8,7 h
SkinEthic™ RHE	-	4 – 10 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	1,4 – 4 mg/mL	-

* Os resultados representam experimentos independentes (n=3) em comparação com o controle ($p < 0,05$).

4.3.4. Aplicabilidade do protocolo USP-RHE para ensaios de avaliação de irritação cutânea *in vitro* (Segundo OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 439 – *In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*)

A funcionalidade de nosso modelo (USP-RHE) foi avaliada pela sua capacidade de responder ao guia OECD 439 distinguindo substâncias irritantes de potencialmente não-irritantes. Como demonstrado na **Figura 8** e nas **Tabelas 6 e 7**, os resultados e protocolo do nosso modelo foram comparáveis com aqueles obtidos *in vivo* e os obtidos para os modelos de referência validados (VRM).

As substâncias irritantes e as não irritantes encontram-se na lista das substâncias (num total de 10) que devem ser inicialmente testadas para validação de um modelo segundo o guia OECD TG 439. Como mostrado na **tabela 6** e na **figura 8**, nosso modelo respondeu de forma satisfatória para as substâncias irritantes e não irritantes avaliadas conseguindo distingui-las adequadamente. O cinamaldeído apesar de ser classificado como um agente não irritante *in vivo*, em todos os modelos validados (VRM) pelo Guia OECD 439 e em nosso modelo foi classificado como potencialmente irritante.

Figura 8 – Ensaio de irritação segundo o Guia OECD 439. C(-) – Controle negativo (PBS), C(+) – Controle positivo (SDS 5 %) e, KOH 5 % (hidróxido de potássio 5 %). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes (n=3). (**) $p < 0,01$; e, (***) $p < 0,001$.

De acordo com as recomendações do guia OECD TG 439, os modelos de RHE para ensaios de irritação cutânea deve apresentar especificidade $\geq 70\%$, sensibilidade $\geq 80\%$ e acurácia $\geq 75\%$, a fim de ser considerado aceitável (Jung et al, 2014; OECD, 2015). Tais parâmetros foram aqui calculados comparando-se o modelo USP-RHE em relação aos resultados obtidos *in vivo* (classificação UN GHS) e em relação resultados obtidos para os modelos de referência validados (VRM) ambos disponíveis no guia OECD 439. A acurácia representa a porcentagem de substâncias irritantes e não irritantes corretamente identificadas, a sensibilidade é definida pela porcentagem de substâncias irritantes corretamente identificadas e, a especificidade, a porcentagem de não irritantes (JUNG et al., 2014). Quando comparados os resultados obtidos para o modelo USP-RHE com os resultados da classificação UN GHS (ensaios *in vivo*) obtivemos acurácia de 92,3 % (12/13) e especificidade de 85,7 % (6/7) devido a apenas o cinamaldeído ter sido identificado como falso positivo. USP-RHE apresentou ainda sensibilidade de 100 % (6/6) classificando corretamente todos os agentes irritantes avaliados. Em relação aos VRMs, o modelo USP-RHE apresentou classificação equivalente para todas as substâncias, indicando 100 % de acurácia (13/13), especificidade (7/7) e sensibilidade (6/6) de acordo com o guia OECD 439 (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Comparação entre os resultados obtidos para os ensaios de avaliação da irritação cutânea segundo a categoria GHS UN (classificação baseada em ensaios *in vivo*), métodos de referência validados pela OECD (VRM) e o modelo USP-RHE de acordo com o guia OECD 439

N.º	Substância	CAS No.	Estado físico	UN GHS Cat.	VRM	USP-RHE
1	Ácido naftalenacético	86-87-3	Sólido	No	NI	NI
2	isopropanol	67-63-0	Líquido	No	NI	NI
3	estearato de metila	112-61-8	Sólido	No	NI	NI
4	butanoato de heptila	5870-93-9	Líquido	No	NI	NI
5	dietilftalato	84-66-2	Líquido	No	NI	NI
6	salicilato de exila	6259-76-3	Líquido	No	NI	NI
7	aldeído cinâmico	104-55-2	Líquido	No	I	I
N.º	Substância	CAS No.	Estado físico	UN GHS Cat.	VRM	USP-RHE
8	Ciclamal	103-95-7	Líquido	R38	I	I
9	1-bromohexano	111-25-1	Líquido	R38	I	I
10	hidróxido de potássio 5% (KOH)	1310-58-3	Líquido	R38	I	I
11	1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	Sólido	R38	I	I
12	tetracloroetileno	127-18-4	Líquido	R38	I	I
13	heptaldeído	111-71-7	Líquido	R38	I	I

I = Substância potencialmente irritante

NI = Substância potencialmente não-irritante

Tabela 7 – Parâmetros dos protocolos específicos para cada um dos métodos validados pelo guia OECD 439 em comparação com os parâmetros definidos para nosso modelo de epiderme humana reconstruída (USP-RHE) para ensaios de irritação

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI 200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPIMODEL2 4 SIT	USP model
A) Pré-incubação					
Tempo de incubação	18 – 24 h	18 – 24 h	< 2 h	15 – 30 h	< 2 h
Volume médio	2 mL	0,9 mL	0,3 mL	0,5 mL	1,5 mL
B) Aplicação das substâncias					
Controle Negativo	PBS	DPBS	PBS	DPBS	PBS
Controle positivo	SDS 5 %	SDS 5 %	SDS 5 %	SDS 5 %	SDS 5 %
Para líquidos	10 µL (26 µL/cm²)	30 µL (47 µL/cm²)	16 µL (32 µL/cm²)	25 µL (83 µL/cm²)	29 µL (26 µL/cm²)
Para sólidos	10 mg (26 mg/cm²) + AD (5 µL)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm²) + AD (10 µL)	25 mg (83 mg/cm²) + AD (25 µL)	29 mg (26 mg/cm²) + AD (25 µL)
Uso de <i>mesh</i> de nylon	Não	Se necessário	Sim	Não	Não
Tempo total de aplicação	15 minutos	60 minutos	42 minutos	15 minutos	15 minutos
Temperatura de aplicação	Temperatura ambiente (TA)	a) TA - 25 minutos b) 37 °C - 35 minutos	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente
C) Volume pós-incubação					
Tempo de incubação	42 ± 1 h	24 ± 2 h & 18 ± 2 h	42 ± 1 h	42 h ± 1 h	42 ± 1 h
Volume médio	2 mL	0,9 mL x 2	2 mL	1 mL	1,5 mL
E) Ensaio de MTT					
Concentração MTT	0,3 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL
Tempo aplicação	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min
Reagente extração	Isopropanol ácido	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol
Volume de extração	2 mL	2 mL	700 µL	0,3 mL	2 mL
Tempo de extração	4 h ou <i>overnight</i>	2 h	2 h	<i>Overnight</i>	2 h
E) Variabilidade máxima aceitável					
Desvio padrão (SD) entre replicatas de tecidos	18 ≤ SD	18 ≤ SD	18 ≤ SD	18 ≤ SD	18 ≤ SD

TA: Temperatura ambiente; AD: água destilada – água destilada; DPBS: Dulbecco's – Tampão fosfato salina.

Fonte: Adaptado de OECD TG 439 e Jung et al., 2014.

5. DISCUSSÃO

Neste capítulo demonstramos o desenvolvimento um modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) bem diferenciada, apresentando morfologia semelhante à pele humana nativa e os parâmetros de controle de qualidade adequados assim como exigido pela OECD em seu guia N.º 439, demonstrando também que o modelo pode ser utilizado para ensaios de irritação cutânea *in vitro*.

Além do importante papel na pesquisa básica, a epiderme reconstruída vem ganhando grande importância na pesquisa aplicada, especialmente como uma alternativa ao uso de animais de laboratório nas indústrias químicas e de cosméticos (POUMAY; COQUETTE, 2007). Como comentado anteriormente, o desenvolvimento desse modelo tem sido um desafio para diversos pesquisadores.

Para a obtenção de um modelo de RHE com diferenciação e proliferação semelhante a da pele humana diversas condições foram testadas após extensa revisão da literatura onde, obtivemos inicialmente o melhor resultado quando reunimos coating de colágeno IV sobre a membrana transwell, adição de TGF- α e meio condicionado oriundo do cultivo de fibroblastos ao meio de cultivo da epiderme e, cultivo em estufa semi-seca (isto é, redução da umidade para cerca de 50 %) nos últimos dias de cultivo.

Segundo Abdel-Naser et al. (2005), o rendimento da cultura celular tem sido melhorado pela incorporação ao meio de suplementos como mitógenos de queratinócitos, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e agentes que aumentem a concentração de AMPc, como a toxina colérica. Tais agentes encontram-se na formulação que utilizamos em nosso laboratório para reconstrução epidérmica. Estudo de Ponec et al., (1997) testou os efeitos na diferenciação epidérmica após a utilização de EGF e TGF- α isolados, em diferentes temperaturas e concentrações de soro. O que o grupo concluiu foi que os dois fatores conseguem proporcionar epidermes bem diferenciadas, mas, esta função é amplamente dependente da temperatura utilizada, no caso, 33 °C para o EGF e 37 °C para TGF- α (PONEC et al., 1997). Assim, em um novo painel de testes optamos pela utilização do TGF- α já que o mesmo é relatado como mais potente que o EGF e não alteraria o ritmo de trabalho de nosso laboratório exigindo, por exemplo, estufas de crescimento exclusivas para este fim. Entretanto, só obtivemos êxito ao testarmos os dois agentes mitógenos em conjunto no meio de cultura. A necessidade do EGF em nosso meio pode ser justificada pelo fato de que o EGF, como demonstrado em estudos de Woodley et al. (1990), aumenta a adesão e propagação dos queratinócitos sobre substratos.

Embora o colágeno IV seja secretado pelos queratinócitos, a utilização de colágeno IV obtido de placenta é importante para a melhoria da fixação, crescimento e a diferenciação dessas células (TINOIS et al., 1991). Células epidérmicas aderem melhor ao colágeno tipo IV enquanto fibroblastos aderem bem a todos os tipos de colágeno (DAWSON et al., 1996; MURRAY et al., 1979). Tal fato foi confirmado por nós quando verificamos uma melhor adesão e crescimento dos queratinócitos em cultura e a formação de multicamadas quando do plaqueamento sobre colágeno IV com exposição à interface ar-líquido por doze dias. O colágeno IV é um importante componente da membrana basal que ajuda na ancoragem da epiderme a derme (BELLAS et al., 2012).

Em condições de crescimento sub-ótimas, os componentes da matriz extracelular podem modular o crescimento de queratinócitos (WOODLEY; WYNN; O'KEEFE, 1990). Segundo Murray et al. (1979) após um período de 12 dias de cultivo das células epidérmicas sobre o colágeno IV, estas formam multicamadas que assumem a aparência de epitélio escamoso, exibindo desmossomos, filamentos de queratina e grânulos de querato-hialina. Estas interações célula-colágeno específicas podem dirigir o crescimento e diferenciação de células e a forma e função dos tecidos (MURRAY et al., 1979).

Diversos trabalhos têm descrito a obtenção de uma epiderme reconstruída *in vitro* em ausência de soro seja no seu desenvolvimento ou no cultivo dos queratinócitos (DOUCET; ROBERT; ZASTROW, 1996; POUMAY et al., 2004; ROSDY; PISANI; ORTONNE, 1993). Murray et al. (1979) observaram que concentrações elevadas de soro inibem a fixação das células epidérmicas ao colágeno IV, mas que ainda são necessárias concentrações mínimas de soro fetal bovino (SFB) para sua fixação, tal fato, pode sugerir um dos motivos pelo qual nosso equivalente de epiderme obteve melhor desenvolvimento e diferenciação após a diminuição do SFB de seu meio de cultivo. Considerando nosso meio de cultivo de RHE, há uma concentração mínima de soro oriunda do meio condicionado obtido de placas de cultivo de fibroblastos. A redução de soro no meio de cultivo do RHE também é importante quando o meio de cultivo não possui grandes quantidades de glicocorticoides, ex.: hidrocortisona, pois em meios contendo soro a síntese de ativador de plasminogênio pelos queratinócitos pode ser prejudicial para o seu crescimento (PEEHL; HAM, 1980). Vale ressaltar que a transferrina, que também foi adicionada ao meio de cultura, compensa a ausência de SFB, pois segundo Keenan et al. (2006) a transferrina é essencial para dar suporte ao crescimento de células MDCK em condições isentas de soro. Equivalentes de pele tradicionalmente têm sido construídos em culturas organotípicas dependentes de soro e/ou meios contendo extratos bovinos pituitários

(BPE). Estas formulações introduzem elementos indefinidos na cultura que são desvantajosos em testes farmacológicos e aplicações clínicas (NG et al., 2011).

A adesão de células epiteliais é promovida pelo uso de meio condicionado e por grandes quantidades de colágeno, mas não por soro (TERRANOVA; ROHRBACH; MARTIN, 1980). Rheinwald e Green (1975) demonstraram que o uso de meio condicionado de células 3T3 foi capaz de formar colônias e queratinização na linhagem XB (queratinócitos derivados de um teratocarcinoma de rato). Assim como neste trabalho, os autores preparavam o meio condicionado por incubação das células por 1 dia em meio contendo SFB. A seguir, esse meio era removido e filtrado em membrana de nitrocelulose e então, utilizado diretamente ou diluído em meio fresco sem soro (como no trabalho citado, utilizamos a 5 % no meio de cultivo da epiderme).

O desenvolvimento epidérmico ideal foi obtido quando juntamos as variáveis discutidas anteriormente e uma atmosfera de baixa umidade. A baixa umidade estimula a síntese de DNA epidérmico e amplifica a resposta hiperproliferativa para ruptura da barreira por tratamento com acetona ou tape stripping (ASHIDA; OGO; DENDA, 2001). A exposição à baixa umidade induz mudanças profundas na proliferação e função da epiderme, há um aumento na síntese de DNA epidérmico em 12 horas de exposição, atingindo o dobro do nível original, e o aumento do nível pode ser mantido por até 5 dias (DENDA, 2000). Tais afirmações sugerem o importante papel da baixa umidade na melhoria do processo de desenvolvimento epidérmico.

O RHE obtido possui semelhança histológica com a epiderme nativa, entretanto, precisava atender aos parâmetros de viabilidade e integridade de função barreira exigidos pela OECD. Os laboratórios que produzem modelos RHE deve controlar cada lote RHE sobre a viabilidade celular, a função de barreira, histologia e a esterilidade, ou seja, viral (HIV I e II, hepatite B e C), a contaminação bacteriana e fungica (MOLINARI et al., 2012; PORTES et al., 2002). Assim, deve-se proceder a um criterioso controle microbiológico no modelo e o USP-RHE atende a essas exigências.

O estrato córneo de modelos RHE deve proporcionar propriedades de barreira similar à pele nativa humana, a fim de ser aplicado como uma ferramenta valiosa para a avaliação da toxicidade cutânea (MOLINARI et al., 2012; PORTES et al., 2002). De acordo com Hoffman et al. (2009), apresentar tolerância contra detergentes é um dos principais indicadores de um RHE com função barreira intacta. Nosso modelo apresenta tolerância adequada ao Triton X-100 e ao SDS, semelhante aos VRM, sugerindo que este modelo tem um estrato córneo suficientemente robusto para resistir à penetração rápida dos produtos químicos. Além disso,

as análises histológicas demonstram que o modelo possui um estrato córneo suficientemente robusto para resistir a uma penetração rápida dos produtos químicos citotóxicos.

A capacidade para distinguir entre produtos químicos irritantes e não-irritantes também reflete a qualidade da função barreira do modelo RHE (COQUETTE et al., 1999). USP-RHE distinguiu satisfatoriamente substâncias irritantes de maneira similar aos VRM como, por exemplo, SkinEthic (COQUETTE et al., 1999), sugerindo que este modelo está pronto para ser utilizado em ensaios de validação inter-laboratorial.

Modelos *in vitro* permitem reduzir o número de animais usados em ensaios laboratoriais; Além disso, eles são altamente reprodutível e apresentam baixa variabilidade (POUMAY; COQUETTE, 2007). Os modelos de RHE representam ferramentas quantitativas objetivas para determinação do potencial de irritação cutânea de uma substância em comparação com a avaliação subjetiva fornecida por ensaios em animais (CHATTERJEE et al., 2006). Além disso, USP-RHE é um modelo promissor não só para ensaios *in vitro* de irritação cutânea, mas também para aplicação em outras áreas de pesquisa como uma alternativa aos testes em animais. Modelos de RHE têm um potencial importante na pesquisa básica e aplicada, bem como nas indústrias químicas e de cosméticos (POUMAY; COQUETTE, 2007).

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados buscando-se desenvolver novos métodos alternativos ao uso de animais para testes de irritação cutânea e ocular e, por esta razão, algumas alternativas para o teste de Draize encontram-se disponíveis (VINARDELL; MITJANS, 2008). O desenvolvimento de novos modelos de RHE significa autonomia para muitos países e empresas. Além disso, as grandes empresas que produzem um único modelo podem também beneficiar desta iniciativa, uma vez que é desejável ter mais de um modelo disponível, a partir de diferentes fontes, atendendo às mesmas exigências, pois, se um modelo *in vitro* não for mais comercializado, temporária ou permanentemente, a empresa seria obrigada a adaptar-se rapidamente para um novo modelo (POUMAY; COQUETTE, 2007). Para uma nova proposta de modelo que requeira validação, independentemente da finalidade ou tipo de estudo o estabelecimento de prioridades deve ser dado aos aspectos científicos desse processo, ao invés dos políticos (VINARDELL; MITJANS, 2008).

6. CONCLUSÃO

Todos os resultados apresentados neste capítulo demonstram que o modelo USP-RHE está em concordância com os dados *in vivo* e com a classificação para os modelos de referência validados (VRM) para ensaios de avaliação de irritação cutânea, atendendo assim, a todos os requisitos para que seja submetido a testes de validação inter-laboratorial. Em conclusão, USP-RHE certamente representa um avanço em métodos alternativos em nosso país.

REFERÊNCIAS

ABDEL-NASER, M. B. et al. Human skin cell culture and its impact on dermatology. **Egyptian Dermatology Online Journal**, v. 1, n. 2, p. 2, 2005.

ASHIDA, Y.; OGO, M.; DENDA, M. Epidermal interleukin-1 α generation is amplified at low humidity: implications for the pathogenesis of inflammatory dermatoses. **British Journal of Dermatology**, 2001.

ARRAES, J. 2016. **Falta investimento para que experimentos com animais sejam substituídos por novos métodos**. Disponível em: <<http://cbn.globoradio.globo.com/editorias/ciencia-saude/2016/07/16/FALTA-INVESTIMENTO-PARA-QUE-EXPERIMENTOS-COM-ANIMAIS-SEJAM-SUBSTITUIDOS-POR-NOVOS-METODO.htm>>. Acesso em: Out 2016.

AUXENFANS, C. et al. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. **European Journal of Dermatology**, 2009.

BAE, I.; PARK, J. W.; KIM, D.-Y. Enhanced regenerative healing efficacy of a highly skin-permeable growth factor nanocomplex in a full-thickness excisional mouse wound model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 4551, 2014.

BELLAS, E. et al. In vitro 3D Full-Thickness Skin-Equivalent Tissue Model Using Silk and Collagen Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 12, p. 1627–1636, 2012.

BRASIL, 2012. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **PORTARIA Nº 491, de 3 de julho de 2012**. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_23490615_PORTARIA_N_491_DE_3_DE_JULHO_DE_2012.aspx>. Acesso em: mar/2015.

BRASIL, 2014. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, de 24 de setembro de 2014**. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0234/234796.pdf>. Acesso em: mar/2015.

BRASIL, 2015. **Resolução ANVISA/DC Nº 35 DE 07/08/2015**. Disponível em: < <https://www legisweb.com.br/legislacao/?id=288036>>. Acesso em: 12 out 2016.

BRASIL, 2016. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016**. Disponível em:

BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: Concepts and applications. **Pigment Cell and Melanoma Research**, 2011.

CARDEAL, L. B. DA S. et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. **PloS One**, v. 7, n. 3, 2012.

CHATTERJEE, A. et al. In vitro and in vivo comparison of dermal irritancy of jet fuel exposure using EpiDermTM(EPI-200) cultured human skin and hairless rats. **Toxicology letters**, v. 167, n. 2, p. 85–94, 2006.

COQUETTE, A. et al. Differential expression and release of cytokines by an in vitro reconstructed human epidermis following exposure to skin irritant and sensitizing chemicals. **Toxicology In Vitro**, v. 13, n. 6, p. 867–877, 1999.

CORSINI, E.; ROGGEN, E. L. Immunotoxicology: Opportunities for non-animal test development. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**. Anais...2009

DAWSON, R. A. et al. Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. **Burns**, v. 22, n. 2, p. 93–100, 1996.

DE VUYST, E. et al. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. **Methods in Molecular Biology**, v. 1195, p. 191–201, 2014.

DE WEVER, B. et al. “Open Source”–Based Engineered Human Tissue Models: A New Gold Standard for Nonanimal Testing Through Openness, Transparency, and Collaboration, Promoted by the ALEXANDRA Association. **Applied In Vitro Toxicology**, v. 1, n. 1, p. 5–9, 2015.

DENDA, M. Influence of dry environment on epidermal function. **Journal of Dermatological Science**, 2000.

DOUCET, O.; ROBERT, C.; ZASTROW, L. Use of a serum-free reconstituted epidermis as a skin pharmacological model. **Toxicology In Vitro**, v. 10, n. 3, p. 305–313, 1996.

EL GHALBZOURI, A.; PONEC, M. Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 3, p. 359–367, 2004.

European Commission, 1986. **Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes**. Official Journal of the European Communities, L358, 1-29.

European Commission, 2012. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/media/photos/rabbit-05.jpg>>. Acesso em: 05 set 2014.

FAPESP, 2014. **Rotas Alternativas**. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2014/06/16/rotas-alternativas-2/>>. Acesso em: set 2014.

FAPESP, 2016. **Pele de laboratório**. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/07/14/pele-de-laboratorio/>>. Acesso em 12 out 2016

FRANKART, A. et al. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. **Experimental dermatology**, v. 21, n. 11, p. 871–875, nov. 2012.

GIBBS, S. et al. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 2, p. 529–541, 15 out. 2013.

GIMENES, F. et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in Semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

GOH, C. L.; SOH, S. D. Occupational dermatoses in Singapore. **Contact Dermatitis**, v. 11, n. 5, p. 288–293, 1984.

HASSKARL, J.; VELUPILLAI, P.; MÜNGER, K. Increased In Vitro Lifespan of Primary Human Keratinocytes Correlates with Decreased Migration. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 1179–1181, maio 2006.

HOFFMANN, J. et al. Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000)—A new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 7, p. 925–929, 2005.

HOLBROOK, K. A.; HENNINGS, H. Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 11s–24s, 1983.

ITO, H. et al. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 21, p. 8797–8802, 2011.

JÚNIOR, G. Ativistas fazem nova invasão ao Instituto Royal e soltam roedores. 13 de novembro de 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sao-paulo/sorocabajundiai/noticia/2013/11/instituto-royal-relata-nova-invasao-em-sao-roque.html>>.

JUNG, K.-M. M. et al. KeraSkin™-VM: A novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 5, p. 742–750, 2014.

KEENAN, J. et al. Evaluation of recombinant human transferrin (DeltaFerrin(TM)) as an iron chelator in serum-free media for mammalian cell culture. **Cytotechnology**, v. 51, n. 1, p. 29–37, 2006.

KEENAN, J.; PEARSON, D.; CLYNES, M. The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. **Cytotechnology**, 2006.

KOIZUMI, H. et al. Beta-adrenergic stimulation induces intracellular Ca⁺⁺ increase in human epidermal keratinocytes. **The Journal of Investigative Dermatology**, 1991.

KORIA, P.; ANDREADIS, S. T. KGF promotes integrin $\alpha 5$ expression through CCAAT/enhancer-binding protein- β . **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 3, p. C1020–C1031, 2007.

LAMB, R.; AMBLER, C. A. Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model. **PloS One**, v. 8, n. 1, p. e52494, 2013.

LEE, C. G. **The Animal Welfare Act at Fifty: Problems and Possibilities in Animal Testing Regulation**. Nebraska Law Review, Forthcoming, 2016.

LEE, H. et al. Alternative models in developmental toxicology. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 1, p. 10–22, 2012.

LEMPER, M.; DE PAEPE, K.; ROGIERS, V. Practical problems encountered during the cultivation of an open-source reconstructed human epidermis model on a polycarbonate membrane and protein quantification. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 2, p. 106–112, 2014.

MAINZER, C. et al. Insulin-transferrin-selenium as an alternative to foetal serum for epidermal equivalents. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 5, p. 427–435, 2014.

MAK, V. H. et al. Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. **The Journal of Investigative Dermatology**, 1991.

MOLINARI, J. et al. Improved procedures for in vitro skin irritation testing of sticky and greasy natural botanicals. **Toxicology in Vitro**, 2012.

MURRAY, J. C. et al. Epidermal cells adhere preferentially to type iv (basement membrane) collagen. **Journal of Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 197–202, 1979.

NG, W. et al. Standardized, defined serum-free culture of a human skin equivalent on fibroblast-populated collagen scaffold. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 91, n. 4, p. 387–391, 2011.

NOLTE, C. J. M. et al. Development of a stratum corneum and barrier function in an organotypic skin culture. **Archives of Dermatological Research**, v. 285, n. 8, p. 466–474, 1993.

OECD. **In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. n. July, p. 1–21, jul. 2015.

PASONEN-SEPPÄNEN, S. et al. Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 4, p. 287–297, 2001.

PEEHL, D.; HAM, R. Growth and differentiation of human keratinocytes without a feeder layer or conditioned medium. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 16, n. 6, p. 516–525, 1980.

PENNACCHI, P. C. et al. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue engineering. Part A**, v. 21, n. 17–18, p. 2417–25, 2015.

PONEC, M. et al. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 3, p. 348–355, 1997.

PORTES, P. et al. Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n. 6, p. 765–770, dez. 2002.

POUMAY, Y. et al. A simple reconstructed human epidermis: Preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. **Archives of Dermatological Research**, v. 296, n. 5, p. 203–211, out. 2004.

POUMAY, Y.; COQUETTE, A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 8, p. 361–369, jan. 2007.

PRUNIÉRAS, M.; RÉGNIER, M.; WOODLEY, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. **The Journal of Investigative Dermatology**, 1983.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Formation of a Keratinizing Epithelium in Culture by a Cloned Cell Line Derived from a Teratoma. **Cell**, 6, 317–330, 1975.

ROGUET, R. et al. Use of a standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, n. 6, p. 409–419, 2000.

ROSDY, M.; PISANI, A.; ORTONNE, J. P. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. **The British Journal of Dermatology**, v. 129, n. 3, p. 227–234, 1993.

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, 2009.

SIVAMANI, R. K.; LAM, S. T.; ISSEROFF, R. R. Beta Adrenergic Receptors in Keratinocytes. **Dermatologic Clinics**, 2007.

SUN, R. et al. Lowered humidity produces human epidermal equivalents with enhanced barrier properties. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 21, n. 1, p. 15–22, 2015.

TAKAGI, R. et al. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, n. 4, p. e63–e73, 2011.

TERRANOVA, V. P.; ROHRBACH, D. H.; MARTIN, G. R. Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. **Cell**, v. 22, n. 3, p. 719–726, 1980.

TINOIS, E. et al. In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. **Experimental Cell Research**, v. 193, n. 2, p. 310–9, 1991.

VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008.

WELSS, T.; BASKETTER, D. A.; SCHRÖDER, K. R. In vitro skin irritation: Facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicology in Vitro**, 2004.

WONG, T.; MCGRATH, J. A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. **British Journal of Dermatology**, 2007.

WOODLEY, D. T.; WYNN, K. C.; O'KEEFE, E. J. Type IV collagen and fibronectin enhance human keratinocyte thymidine incorporation and spreading in the absence of soluble growth factors. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 94, n. 1, p. 139–143, 1990.

WORTH, A et al. **Alternative methods for regulatory toxicology – a state-of-the-art review**. EUR - Scientific and Technical Research Reports. Publications Office of the European Union. 2014.

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de ensaios de sensibilização em epiderme humana reconstruída (RHE) em co-cultura com células monocíticas THP-1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sensibilização cutânea

A Dermatite de Contato Alérgica (DCA) é um efeito adverso que frequentemente aparece após exposição de trabalhadores e consumidores a substâncias e/ou produtos sensibilizantes (STRICKLAND et al., 2016). A DCA é uma doença inflamatória cutânea associada a proliferação de células T, cujo desenvolvimento é bem conhecido e divide-se em dois estágios: etapa de indução e etapa de elicitação (**Figura 9**) (KIMBER et al., 2011; STRICKLAND et al., 2016; TOEBACK et al., 2009).

Na etapa de indução, um indivíduo susceptível é exposto topicamente a substâncias de baixo peso molecular ou íons metálicos que penetram o estrato córneo e ligam-se de forma covalente às proteínas cutâneas, formando haptenos (PEISER et al., 2012; STRICKLAND et al., 2016a). Como consequência, os queratinócitos são ativados e aumentam a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) resultando na migração e ativação das células dendríticas da derme (BOUR et al., 1995; SAINT-MEZARD et al., 2004) formando, genericamente, um complexo hapteno com as proteínas dérmicas. Esse complexo hapteno é processado pelas células de Langerhans (LCs), as células apresentadoras de antígenos na pele, e transportado pelas LCs para os linfonodos (STRICKLAND et al., 2016) onde células T específicas são recrutadas para proliferação (BOUR et al., 1995; SAINT-MEZARD et al., 2004).

A fase de elicitação da DCA ocorre quando há uma re-exposição a mesma substância, onde os mesmos processos da fase de indução são observados, (STRICKLAND et al., 2016a) no entanto, com um rápido recrutamento de células T efectoras na pele, resultando em inflamação que ocorre via indução de apoptose nos queratinócitos (BOUR et al., 1995; KEHREN et al., 1999).

Atualmente, há uma tendência mundial na busca pela redução, refinamento ou substituição dos ensaios em animais, e assim, ensaios como o ensaio do linfonodo local (LLNA, do inglês, Local lymph node assay) foram desenvolvidos visando a redução do uso de animais para ensaios de sensibilização (ANDERSON; SIEGEL; MEADE, 2011). Em contrapartida, para validação do potencial de sensibilização *in vitro* não existem modelos completamente

validados (GUYARD-NICODÈME et al., 2015). Cada uma das metodologias alternativas *in vitro* validadas disponíveis atualmente detecta eventos pontuais da etapa de indução da sensibilização, como por exemplo, a reatividade com proteínas (DPRA), a ativação de queratinócitos (KeratinoSense) e a ativação das células dendríticas (h-CLAT) (BASKETTER; MAXWELL, 2007; GERBERICK et al., 2007). Assim, o desenvolvimento de um modelo completo para estudo de potencial de sensibilização cutânea apresenta-se como um desafio imediato e importante para a indústria cosmética (GUYARD-NICODÈME et al., 2015).

Figura 9 – Mecanismos subjacentes à sensibilização cutânea durante as fases de sensibilização e de elicitação: (1) Os haptenos penetram a epiderme viável; (2) A ligação de haptenos e proteínas da pele; (3) As células de Langerhans (LCs) ligam-se ao complexo hapteno-proteína e diferenciam-se em células dendríticas (DCs) maduras durante a migração para o nódulo linfático; (4) LCs apresentam as proteínas conjugadas a hapteno aos linfócitos-T naíve; (5) Expansão clonal das células T efetoras (naíve) e de memória específicas; (6) Proliferação de linfócitos T que difundem-se para a circulação sanguínea, resultando na sensibilização do indivíduo; (7) Re-exposição de haptenos semelhantes para o mesmo indivíduo; (8) Liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células epidérmicas; (9) Infiltração de células T a partir de vasos sanguíneos no local de contato; (10) Desenvolvimento de dermatite de contato alérgica (DCA).

Fonte: Adaptado de Wong et al., 2015.

1.2. Métodos validados para avaliação de sensibilização cutânea *in vitro*

A avaliação do potencial de sensibilização cutânea é um importante parâmetro para avaliação de risco de substâncias que entram em contato com a pele (URBISCH et al., 2016), e, sendo a sensibilização cutânea uma resposta imunológica complexa, um único ensaio não fornece informações suficientes para permitir a identificação de potenciais sensibilizantes (AEBY et al., 2010; CORSINI et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2009). Assim, em 2012 a OECD publicou um documento onde descreve os acontecimentos que levam a sensibilização da pele, conhecido como AOP (*adverse outcome pathway*) e recentemente validou três ensaios, DPRA (*direct peptide reactivity assay*) (OECD, 2015a), KeratinoSensTM (OECD, 2015b) e h-CLAT (*human Cell Line Activation Test*) (OECD, 2016) que devem ser utilizados em conjunto, em um protocolo conhecido como “Estratégia Integrada de Testes” (ITS, *integrated testing strategy*), para determinação do potencial de sensibilização de uma substância (URBISCH et al., 2016). Os ensaios integrantes da ITS estão descritos a seguir:

1.2.1. DPRA (direct peptide reactivity assay)

O Ensaio de Reatividade Direta de Peptídeo (DPRA, do inglês Direct Peptide Reactivity Assay) é uma metodologia *in chemico* desenvolvida para avaliação do processo de haptenação, o qual baseia-se na ligação de substâncias de baixo peso molecular (haptenos) à proteínas cutâneas ou, mais especificamente, a ligação de potenciais sensibilizantes com regiões eletrofílicas da pele que são responsáveis por iniciar o processo de sensibilização cutânea (GERBERICK et al., 2004; OECD, 2015a).

Neste ensaio, a substância testada deve reagir com peptídeos sintéticos (cisteína e lisina), de modo que, a depleção do peptídeo livre medida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) indique um potencial de sensibilização cutâneo (**Figura 10a**) (GERBERICK et al., 2004). Uma das limitações do DPRA é que este ensaio não prevê o potencial de sensibilização de pré ou pró-haptenos, os quais requerem ativação metabólica ou química para se tornarem reativos com proteínas (GERBERICK et al., 2009).

Quando comparado com ensaios *in vivo*, no caso, o ensaio do linfonodo local (LLNA, *local lymph node assay*), o DPRA apresentou concordância de 89 % com a classificação de potência de sensibilização (isto é, fraco, moderado etc) (HARTUNG et al., 2004).

1.2.2. KeratinoSens™

O ensaio KeratinoSens™, desenvolvido pelo Dr Andreas Natsch, representa o segundo evento chave na sensibilização cutânea, o qual se baseia na ativação de queratinócitos e sua capacidade de metabolizar pró-haptenos (URBISCH et al., 2015). Este ensaio vem sendo recomendado pelo EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing) desde 2014 como um dos componentes da estratégia integrada de testes (ITS) para sensibilização cutânea (OECD, 2015b).

O KeratinoSens™ usa queratinócitos imortalizados transfectados (HaCaT) em monocamada, que contém a sequência ARE do gene envolvido com a ativação da via dependente do elemento de resposta antioxidante (Keap1-Nrf2-ARE) em queratinócitos, um mecanismo chave da sensibilização dérmica (**Figura 10b**) (DINKOVA-KOSTOVA; HOLTZCLAW; KENSLER, 2005; EMTER; ELLIS; NATSCH, 2010; NATSCH; EMTER, 2008). Este ensaio apresentou 73 % de concordância com ensaios *in vivo* (LLNA), enquanto que os ensaios que compõe a ITS (DPRA, KeratinoSens™ e H-Clat), quando analisados em conjunto, apresentaram precisão de 79 % quando comparados ao mesmo ensaio *in vivo* (URBISCH et al., 2015).

1.2.3. h-CLAT (Human Cell line activation test)

O ensaio Teste de ativação de célula humana (h-CLAT, do inglês *human Cell Line Activation Test*) distingue agentes sensibilizantes de não sensibilizantes por meio da medida da expressão de marcadores de superfície celular como CD86 e CD54 presentes na linhagem monocítica THP-1 (ASHIKAGA et al., 2010; CAO et al., 2012; MEHLING et al., 2012; SAKAGUCHI et al., 2009).

As células THP-1 são comercialmente disponíveis (YOSHIDA et al., 2003) e tem maior plasticidade fenotípica quando comparada com outras linhagens (CAO et al., 2012). Para o ensaio de h-Clat, primeiramente elas são tratadas com a substância de interesse por 24 h e depois, por citometria de fluxo, a expressão de CD86 e CD54 é avaliada (**Figura 10c**) (OECD, 2016). Para determinar se o composto estudado é sensibilizante ou não, as medidas dos marcadores de membrana devem exceder o critério de positividade, ou seja, os valores de intensidade de fluorescência relativa (RFI, do inglês Relative Fluorescence Index) devem ser ≥ 150 % para CD86 e ≥ 200 % para CD54 (ASHIKAGA et al., 2010). A acurácia do ensaio de h-CLAT quando comparado com LLNA é em torno de 84 % (ASHIKAGA et al., 2010).

Há a necessidade do estabelecimento de modelos mais precisos e fisiologicamente relevantes para a avaliação de substâncias que possam causar sensibilização cutânea e que compreendam os aspectos éticos da experimentação em animais. Embora exista certo número de modelos de equivalentes de pele humana, há poucos modelos de pele “imunocompetentes” e, portanto, adequados para a realização de estudos de sensibilização cutânea (CHAU et al., 2013).

Figura 10 – Diagrama esquemático que resume os passos envolvidos na realização dos ensaios *in vitro* atualmente disponíveis e validados pela OECD para a avaliação do potencial de sensibilização cutâneo. A. Ensaio de Reatividade Direta de Peptídeo (DPRA); B. KeratinoSens™; C. Teste de ativação de célula humana (h-CLAT).

Fonte: Adaptado de Wong et al., 2015.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver um modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) imunocompetente, baseado em um *crostalking* entre o RHE e as células imunes THP-1, como plataforma para avaliação de sensibilização cutânea *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade das células THP-1 por meio da correta expressão de marcadores de membrana (CD86/CD54);
- Avaliar, por meio de marcadores histológicos, os efeitos de compostos sensibilizantes e não sensibilizantes sobre o RHE imunocompetente (RHEI);
- Avaliar os efeitos de compostos sensibilizantes e não sensibilizantes em células THP-1 em monocultivo e quando presentes no RHEI por meio da liberação de mediadores solúveis ou expressão de marcadores de membrana (CD86/CD54);

3. METODOLOGIA

3.1. Avaliação da toxicidade de compostos sensibilizantes e não sensibilizantes sobre a epiderme humana reconstruída (RHE) por ensaio de MTT

A viabilidade celular da RHE foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), que é baseado na redução do sal pelo sistema enzimático mitocondrial, por meio da atividade de desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, refletindo o funcionamento normal da mitocôndria e consequentemente a viabilidade celular (BERRIDGE et al., 1996). Após 24 horas de tratamento, 300 µL por poço de uma solução de MTT em PBS (1 mg/mL) foi adicionada sob o *transwell* em uma placa de 12 poços. Em seguida, a placa foi incubada por 3 horas, em estufa de 5% de CO₂ e ao abrigo da luz, para permitir a formação do formazan (precipitado), que foi dissolvido em isopropanol. A absorbância de cada poço foi lida por um leitor de microplaca em 570 nm. Dessa forma, determinamos a curva de toxicidade para cada substância testada e o efeito tóxico destas formulações. A curva de toxicidade determinou o valor da IC₅₀ (concentração de uma substância que reduz a viabilidade celular do equivalente de epiderme em 50%) de cada substância.

3.2. Avaliação da qualidade e funcionalidade da linhagem celular THP-1

3.2.1. Cultura da linhagem de células monocíticas (THP-1)

Células THP-1 obtidas do ATCC (American Type Culture Collection) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Alemanha) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10 % (Biochrom AG, Alemanha), 2-mercaptoetanol a 0,05 mM, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Biochrom AG, Alemanha). As células foram mantidas em atmosfera umidificada a 37 °C e 5 % de CO₂ e subcultivadas a cada 3-4 dias em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/mL por um máximo de 5 passagens.

3.2.2. Análise do fenótipo celular por citometria de fluxo

Isotipos de controle, um único marcador PE e um único marcador FITC, foram analisados para ajuste dos canais do citômetro. Utilizou-se 1×10^6 células por marcador a ser analisado. Para isso, adicionou-se a solução tampão para citometria de fluxo - *FACS buffer* - (PBS com 1% sódio azido e 1% BSA) às células previamente coletadas em um tubo próprio para citometria de fluxo. Em seguida, centrifugou-se os tubos com as células, removeu-se o sobrenadante, ressuspendeu-se as células no *FACS buffer*, adicionou-se os marcadores e incubou-se por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se 300 μ L de *FACS buffer* e analisou-se a expressão dos marcadores por citometria de fluxo. Os seguintes marcadores de superfície foram utilizados para a checagem da qualidade dessas células: CD54 e CD86. Além disso, a viabilidade celular foi analisada pela marcação com iodeto de propídeo (PI). Para proceder experimentalmente com as células THP-1, essas células devem apresentar confluência mínima de 75 % (ASHIKAGA et al., 2010).

3.2.3. Avaliação da secreção de interleucina-8 (IL-8) pelas células THP-1 após exposição a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes

Após 24 horas de tratamento com os diferentes compostos, coletou-se o sobrenadante das células THP-1 para a quantificação de IL-8 por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). ELISA é uma técnica bioquímica usada para detectar a presença de uma proteína secretada por um tecido em uma amostra de sobrenadante. Esta técnica usa dois anticorpos: o primeiro liga-se especificamente a proteína analisada e o outro reage com o complexo proteína-anticorpo primário e, em conjunto com uma enzima, geram um substrato cromogênico cujo sinal é detectado por um espectrofotômetro. Os valores de absorbância obtidos são comparados a uma curva padrão e, dessa forma, a concentração de proteína no sobrenadante é determinada (ENGVAL; PERLMANN, 1972).

3.3. Geração da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) (*cross talk* THP-1/RHE)

O modelo de epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) foi desenvolvido em um sistema de cultura *transwell*, onde o RHE foi cultivado na parte superior da membrana do *transwell* e as células THP-1 cultivadas submersas em meio de cultura na parte inferior do

poço. Uma vez exposta topicamente a agentes sensibilizantes (4-dinitroclorobenzeno, brometo de 4-nitrobenzilo, aldeído cinâmico, resorcinol e eugenol) e não sensibilizantes (fenol, DMSO, isopropanol e ácido láctico), a RHE deveria secretar citocinas que se difundiriam no meio de cultura ativando as células THP-1. O sistema *transwell* permite a comunicação celular entre os componentes da RHE com as células THP-1, criando assim um equivalente de epiderme capaz de gerar uma resposta imunológica, mimetizando a situação *in vivo*. Células THP-1 (5×10^5 células/mL de meio por poço) foram plaqueadas em uma placa de 12 poços. Em seguida, transferiu-se os equivalentes de epiderme cultivados previamente no *transwell* para essa placa cujo fundo é preenchido com as THP-1, de forma a manter a interface ar-líquido para a epiderme. Dessa forma, os equivalentes de epiderme estavam em contato com as THP-1 por meio de mediadores solúveis liberados no compartimento inferior via meio de cultura e prontos para serem expostos a diferentes substâncias.

3.3.1. Exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a substâncias conhecidas sensibilizantes e não sensibilizantes para avaliação da funcionalidade do modelo frente a ensaios de sensibilização

Agentes sensibilizantes e não sensibilizantes foram aplicados topicamente, 30 μ L de solução de cada substância em diferentes concentrações sobre o extrato córneo do equivalente (mimetizando o “*patch test*” em humanos). Após 24 h, o RHEI foi lavado e dividido para as análises, sendo o RHEI utilizado para análises imunohistoquímicas e de toxicidade por MTT e, as células THP-1, analisadas por citometria de fluxo para expressão de CD86 e CD54. O meio de cultura abaixo do transwell foi armazenado para análise de liberação de citocinas, IL-8 e IL-1 α , por ELISA.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da funcionalidade da linhagem celular THP-1 – *Human cell line activation test* (h-Clat)

4.1.1. Obtenção da CV₇₅ por estudo da citotoxicidade por iodeto de propídeo (PI).

A avaliação da viabilidade celular da linhagem celular THP-1 foi realizada utilizando-se o marcador fluorescente iodeto de propídeo (PI), que apresenta a capacidade de se ligar ao DNA apenas das células que apresentaram ruptura da membrana citoplasmática.

O ensaio de sensibilização utilizando a linhagem celular THP-1 é denominado “*human cell line activation test*” (h-Clat) o qual demonstra grande reprodutibilidade inter-laboratorial e alta capacidade de previsão de sensibilização. Entretanto, para que a linhagem possa expressar corretamente os marcadores de membrana faz-se necessário uma viabilidade mínima de 75 % (CV₇₅) (ASHIKAGA et al., 2010).

Uma extensa revisão da literatura foi realizada a fim de avaliar qual o comportamento esperado para a linhagem celular (**ANEXO**). Dessa maneira, ao analisarmos os resultados de viabilidade celular obtidos calculamos a CI₅₀ (Concentração Inibitória, na qual a viabilidade celular está reduzida em 50 %) e a CV₇₅ (Concentração onde 75 % das células estão viáveis) para nove substâncias, sendo cinco sensibilizantes (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (controle positivo), brometo de 4-nitrobenzilo, aldeído cinâmico, resorcinol e eugenol) e quatro não sensibilizantes (fenol, DMSO, isopropanol e ácido láctico). Tais resultados encontram-se na **Tabela 8**.

A partir dos ensaios de citotoxicidade por PI, foram avaliados quatro sensibilizantes, o controle positivo (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), um sensibilizante extremo (brometo de 4-nitrobenzilo), um moderado (resorcinol) e um fraco (eugenol) e, dois não-sensibilizantes, ácido láctico (controle negativo) e DMSO (dimetilsulfóxido). As concentrações de estudo para os próximos testes em monocamada foram definidas a partir da CV₇₅ obtida no ensaio de citotoxicidade por PI acrescentando-se como concentrações de estudo a 0,5xCV₇₅ (concentração correspondente a metade da CV₇₅) e a 0,1xCV₇₅ (concentração correspondente a diluição da CV₇₅ 1:10).

Tabela 8 – Ensaio de citotoxicidade da linhagem monocítica THP-1 por iodeto de propídeo.

ALÉRGENOS					
	Substância	IC 50 Obtida	IC 50 LITERATURA*	CV 75 obtida	CV 75 LITERATURA*
1	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno	7,7 µg/mL	5,0 µg/mL	4,5 µg/mL	3,0 – 9,3 µg/mL
2	brometo de 4-nitrobenzilo	9,2 µg/mL	-	3,7 µg/mL	3,6 µg/mL
3	aldeído cinâmico	48 µg/mL	70 µg/mL	6 µg/mL	12,7-54,9 µg/mL
4	resorcinol	>1,6 mg/mL	1,4 – 4,9 mg/mL	1,6 mg/mL	613,4–1600 µg/mL
5	eugenol	326,7 µg/mL	175-213 µg/mL	190,9 µg/mL	140-320 µg/mL
NÃO – ALÉRGENOS					
	Substância	IC 50 Obtida	IC 50 LITERATURA*	CV 75 obtida	CV 75 LITERATURA*
1	fenol	721,0 µg/mL	-	475,7 µg/mL	308-390 µg/mL
2	DMSO	> 5 mg/mL	2,5 ou >5 mg/mL	> 5 mg/mL	> 5 mg/mL
3	Isopropanol	> 5 mg/mL	5-16 mg/mL	> 5 mg/mL	> 5 mg/mL
4	ácido láctico	>2,5 mg/mL	2,4 ou >5 mg/mL	2,5 mg/mL	2,8 mg/mL

Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes (n=3). CI₅₀: Concentração Inibitória 50 %; CV₇₅: Concentração onde há 75 % de viabilidade.

* Referências encontram-se na tabela em ANEXO.

4.1.2. Sensibilização da linhagem THP-1 no h-Clat – Expressão de CD86 e CD54 após exposição a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes

Para avaliarmos se a linhagem THP-1 utilizada em nosso laboratório encontrava-se funcional, primeiramente avaliamos a expressão de CD86/CD54 após exposição a cada agente sensibilizante e não sensibilizante. Para determinarmos a expressão dos marcadores, calculamos o *Relative Fluorescence Index* (RFI) que indica expressão positiva (+) para CD86 quando este é ≥ 150 e para CD54 quando ≥ 200 (SAKAGUCHI et al., 2007). Os resultados obtidos encontram-se expressos na **tabela 9** onde é possível observar que a linhagem THP-1 conseguiu distinguir satisfatoriamente sensibilizantes de não sensibilizantes.

Tabela 9 – Avaliação da expressão dos marcadores CD86 e CD54 após exposição da linhagem THP-1 a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes

	CV75			0,5xCV75			0,1xCV75		
	CD86	CD54	Classif.	CD86	CD54	Classif.	CD86	CD54	Classif.
DNCB	+	+	S	+	+	S	+	+	S
NBZ	+	+	S	+	+	S	+	+	S
Res	+	+	S	+	+	S	+	+	S
Eu	+	+	S	+	+	S	+	-	S
D	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
AL	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS

(+) positivo para CD86 quando RFI obtido foi ≥ 150 e para CD54 quando ≥ 200 .

Os resultados representam experimentos independentes (n=3) onde $p < 0,05$.

DNCB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), NBZ (brometo de 4-nitrobenzilo), Res (resorcinol), Eu (eugenol), D (DMSO), AL (Ácido Lático), Classif. (Classificação), S (Sensibilizante), NS (Não-sensibilizante).
 DNCB CV₇₅ = 4,5 µg/mL; DNCB 0,5xCV₇₅ = 2,25 µg/mL; DNCB 0,1xCV₇₅ = 0,45 µg/mL; NBZ CV₇₅ = 3,7 µg/mL; NBZ 0,5xCV₇₅ = 1,85 µg/mL; NBZ 0,1xCV₇₅ = 0,37 µg/mL; R CV₇₅ = 1,6 mg/mL; R 0,5xCV₇₅ = 800 µg/mL; R 0,1xCV₇₅ = 160 µg/mL; EU CV₇₅ = 190,9 µg/mL; EU 0,5xCV₇₅ = 95,45 µg/mL; 0,1xCV₇₅ = 19,09 µg/mL; D CV₇₅ = 5 mg/mL; D 0,5xCV₇₅ = 2,5 mg/mL; D 0,1xCV₇₅ = 1,25 mg/mL; AL CV₇₅ = 2,5 mg/mL; AL 0,5xCV₇₅ = 1,25 mg/mL; AL 0,1xCV₇₅ = 0,625 mg/mL;

4.2. Avaliação da secreção de IL-8 pela linhagem monocítica THP-1 após exposição a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes

A secreção de IL-8 pela linhagem THP-1 após exposição a agentes não sensibilizantes (dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido lático) e agentes sensibilizantes de diferentes potências (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno – extremo, brometo de 4-nitrobenzilo – extremo; resorcinol – Moderado; e, eugenol – Fraco) foi avaliada por ensaio de ELISA. A **Figura 11** mostra os níveis de IL-8 após a exposição as substâncias onde observamos que a avaliação da secreção de IL-8 consegue distinguir agentes sensibilizantes e não sensibilizantes e consegue ranquear os sensibilizantes extremos diferenciando-os dos agentes moderados/fracos.

Figura 11 – Liberação de IL-8 pela linhagem THP-1 após 24 h de exposição a compostos sensibilizantes e não sensibilizantes.

Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes (n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; e, (***) $p < 0,001$.

Sensibilizantes: CN – Controle negativo (PBS); Sensibilizantes: DNCB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, NBZ – brometo de 4-nitrobenzilo, R – resorcinol, Eu – eugenol. Não sensibilizantes: D – dimetilsulfóxido (DMSO), AL – ácido lático.

DNCB CV_{75} = 4,5 $\mu\text{g/mL}$; DNCB 0,5 $\times CV_{75}$ = 2,25 $\mu\text{g/mL}$; DNCB 0,1 $\times CV_{75}$ = 0,45 $\mu\text{g/mL}$; NBZ CV_{75} = 3,7 $\mu\text{g/mL}$; NBZ 0,5 $\times CV_{75}$ = 1,85 $\mu\text{g/mL}$; NBZ 0,1 $\times CV_{75}$ = 0,37 $\mu\text{g/mL}$; R CV_{75} = 1,6 mg/mL ; R 0,5 $\times CV_{75}$ = 800 $\mu\text{g/mL}$; R 0,1 $\times CV_{75}$ = 160 $\mu\text{g/mL}$; Eu CV_{75} = 190,9 $\mu\text{g/mL}$; Eu 0,5 $\times CV_{75}$ = 95,45 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\times CV_{75}$ = 19,09 $\mu\text{g/mL}$; D CV_{75} = 5 mg/mL ; 0,5 $\times CV_{75}$ = 2,5 mg/mL ; 0,1 $\times CV_{75}$ = 1,25 mg/mL ; AL CV_{75} = 2,5 mg/mL ; AL 0,5 $\times CV_{75}$ = 1,25 mg/mL ; AL 0,1 $\times CV_{75}$ = 0,625 mg/mL ;

4.3. Geração do modelo de equivalente de epiderme imunocompetente

O modelo de equivalente de epiderme imunocompetente é formado por um *crosstalk* entre uma epiderme humana reconstruída (RHE) e células imunes, que em nosso modelo foi a linhagem celular THP-1. Nesse modelo, o RHE e a linhagem celular THP-1 são gerados/cultivados separadamente, sendo que os mesmos são colocados em contato em cultura. O RHE é desenvolvido em interface ar-líquido sobre uma membrana *transwell* e as células THP-1 permanecem submersas em meio de cultivo no compartimento inferior do *transwell*, logo abaixo da membrana (**Figura 12**). Este modelo permite que os dois tipos celulares comuniquem-se por meio de mediadores solúveis, sem contatos celulares diretos, o que possibilita o isolamento e análise dos dois tipos celulares independentemente (OUWEHAND et al., 2011).

Figura 12 – Ilustração representativa da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI). O modelo compreende um *crosstalk* entre uma epiderme humana reconstruída (RHE) desenvolvida sobre uma membrana *transwell* e células THP-1 submersas em meio de cultura no compartimento inferior.

Portanto, para a geração da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) primeiramente geramos uma epiderme humana reconstruída (RHE) e, em seguida, realizamos o controle de qualidade histológico e imunohistoquímico para avaliação da diferenciação e estratificação epidérmica; em paralelo, trabalhando com as células THP-1 em cultura, avaliamos a citotoxicidade e a expressão de marcadores de membrana (CD86/CD54) quando expostas aos compostos escolhidos para fins de avaliação da resposta imunológica celular e consequente validação da cultura.

4.4. Funcionalidade do modelo de epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI)

4.4.1. Avaliação da citotoxicidade dos compostos em equivalente de epiderme imunocompetente (EEI)

Oito compostos tiveram sua citotoxicidade avaliada na linhagem THP-1 em monocultivo e dentre esses, quatro foram selecionados para a avaliação funcionalidade do EEI, sendo, três sensibilizantes (brometo de 4-nitrobenzilo, resorcinol e eugenol) e um não-sensibilizante (DMSO).

A citotoxicidade dos compostos sobre o EE foi avaliada pelo ensaio de MTT. Como demonstrado na **Figura 13**, os compostos, mesmo em concentrações correspondentes a CI_{50} na THP-1 em monocultivo, não foram capazes de causar redução significativa na viabilidade do EE. Ainda, os resultados indicam que esses compostos também não foram citotóxicos para as células THP-1 através do *crosstalk*.

Figura 13 – Viabilidade do equivalente de epiderme e da THP-1 após exposição do EEI aos compostos. A. Viabilidade do equivalente de epiderme após exposição aos compostos. B. Viabilidade da célula THP-1 em *cross talk*.

Os valores de CI₅₀ (NBZ e EU), 2xCI₅₀ (R e D), CV₇₅, 0,5xCV₇₅ e 0,1xCV₇₅ são referentes aos valores de citotoxicidade determinados para a THP-1 em monocultivo. NBZ (brometo de 4-nitrobenzilo), Res (resorcinol), Eu (eugenol), DMSO (dimetilsulfóxido) e Cneg (controle negativo - PBS). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes (n=3) em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$). B. Viabilidade da linhagem celular THP-1 no EEI. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes (n=3) em comparação com o controle negativo (PBS) ($p < 0,05$).

NBZ CI₅₀ = 9,2 μ g/mL; NBZ CV₇₅ = 3,7 μ g/mL; NBZ 0,5xCV₇₅ = 1,85 μ g/mL; NBZ 0,1xCV₇₅ = 0,37 μ g/mL; R 2xCV₇₅ = 3,2 mg/mL; R CV₇₅ = 1,6 mg/mL; R 0,5xCV₇₅ = 800 μ g/mL; R 0,1xCV₇₅ = 160 μ g/mL; EU CI₅₀ = 326,7 μ g/mL; EU CV₇₅ = 190,9 μ g/mL; EU 0,5xCV₇₅ = 95,45 μ g/mL; EU 0,1xCV₇₅ = 19,09 μ g/mL; D 2xCV₇₅ = 10 mg/mL; D CV₇₅ = 5 mg/mL; D 0,5xCV₇₅ = 2,5 mg/mL; D 0,1xCV₇₅ = 1,25 mg/mL.

Na **figura 14** estão representadas as epidermes tratadas com o controle negativo (PBS), um composto não sensibilizante (DMSO) e três compostos sensibilizantes (brometo de 4-nitrobenzilo, resorcinol e eugenol). Nesta figura podemos observar que o controle (**12A**) e o DMSO (**14B**) apresentam uma epiderme normal e bem diferenciada diferente das tratadas com os sensibilizantes (**14C**, **14D** e **14F**) que apresentam edema ou espongiose (característica que dá o aspecto de perda de celularidade a epiderme), vacuolização e presença de picnose que diminui conforme a potência do sensibilizante. Outro fato pouco evidenciado, mas presente, é a alteração na camada córnea nas epidermes sensibilizadas.

Figura 14 – Fotomicrografias representativas da histologia das epidermes após tratamento ou não com os agentes sensibilizantes.

Os resultados representam experimentos independentes (n=3). Aumento: 20X. (bar= 200 µm).

A. Controle negativo (PBS); B. DMSO (dimetilsulfóxido – 10 mg/mL); C. brometo de 4-nitrobenzilo (9,2 µg/mL); D. resorcinol (3,2 mg/mL); e, E. eugenol (326,7 µg/mL).

4.4.2. Avaliação da expressão dos marcadores CD86 e CD54 na linhagem celular THP-1 após exposição do EEI aos agentes sensibilizantes e não sensibilizantes

Ao avaliarmos os resultados obtidos para o EEI em comparação com os resultados obtidos em monocultivo para THP-1, notamos que uma expressão mais elevada dos marcadores de membrana CD86 e CD54 é observada quando o sensibilizante é aplicado sobre o EEI (**Figura 15**) e, notamos que não há um padrão de expressão dos marcadores, medido em valores de RFI, demonstrando que os valores RFI são importantes apenas para distinguir sensibilizantes de não sensibilizantes, no entanto, não se modificam conforme o grau de sensibilização ocorrido sendo incapaz de hierarquizar os compostos segundo a potência de sensibilização.

Figura 15 – Expressão dos marcadores CD86 e CD54 em valores de RFI (*Relative Fluorescence Index*) após exposição aos compostos da linhagem THP-1 em monocultivo ou em *cross talk* no equivalente de epiderme imunocompetente (EEI).

Os gráficos representam a média $\pm$ SD de experimentos independentes (n=3). (*) p < 0,05, (**) p < 0.005 e (***) p < 0,001 em comparação com a mesma concentração em monocultivo.

NBZ CV₇₅ = 3,7 μ g/mL; NBZ 0,5xCV₇₅ = 3,7 μ g/mL; NBZ 0,1xCV₇₅ = 0,37 μ g/mL; R CV₇₅ = 1,6 mg/mL; R 0,5xCV₇₅ = 800 μ g/mL; R 0,1xCV₇₅ = 160 μ g/mL; EU CV₇₅ = 190,9 μ g/mL; EU 0,5xCV₇₅ = 95,45 μ g/mL; 0,1xCV₇₅ = 19,09 μ g/mL; D CV₇₅ = 5 mg/mL; 0,5xCV₇₅ = 2,5 mg/mL; 0,1xCV₇₅ = 1,25 mg/mL;

4.4.3. Avaliação da liberação de citocinas após exposição do EEI aos agentes sensibilizantes e não sensibilizantes

Para avaliarmos se a secreção das interleucinas IL-8 e IL-1 α pelo equivalente de epiderme imunocompetente (EEI) era capaz de distinguir compostos sensibilizantes de não sensibilizantes e de definir a potência dos sensibilizantes avaliou-se por ensaio de ELISA o meio que encontrava-se abaixo do transwell, após isolamento da linhagem THP-1 que nele estava submersa.

A **figura 16A** mostra os níveis de IL-8 após a exposição do EEI as substâncias onde observa-se que a secreção de IL-8 não consegue distinguir sensibilizantes de não sensibilizantes diferentemente do que ocorre para a linhagem THP-1 em monocultivo.

Na **figura 16B** apresentamos os níveis de secreção de IL-1 α , demonstrando que este parâmetro é capaz de distinguir compostos sensibilizantes de não sensibilizantes em algumas concentrações estudadas, entretanto, não consegue definir a potência. Em estudos ainda não

publicados realizados em colaboração com a pós-doutoranda Thalita Zanoni conseguimos demonstrar que a epiderme utilizada isoladamente, ou seja, sem *crosstalking* com as células THP-1 consegue distinguir substâncias sensibilizantes das não sensibilizantes de maneira satisfatória bem como definir a potência de sensibilização.

Figura 16 – Liberação de IL-8 e IL-1α pelo EEI após 24 h de exposição a compostos sensibilizantes e não sensibilizantes.

Sensibilizantes: NBZ –brometo de 4-nitrobenzilo (Extremo); R – resorcinol (Moderado); e, EU – eugenol (Fraco). Não sensibilizantes: D – dimetilsulfóxido (DMSO). Os gráficos representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=3). (**) $p < 0,01$ em comparação com o controle (CN).

NBZ CI₅₀ = 9,2 μ g/mL; NBZ CV₇₅ = 3,7 μ g/mL; NBZ 0,5xCV₇₅ = 1,85 μ g/mL; NBZ 0,1xCV₇₅ = 0,37 μ g/mL; R 2xCV₇₅ = 3,2 mg/mL; R CV₇₅ = 1,6 mg/mL; R 0,5xCV₇₅ = 800 μ g/mL; R 0,1xCV₇₅ = 160 μ g/mL; EU CI₅₀ = 326,7 μ g/mL; EU CV₇₅ = 190,9 μ g/mL; EU 0,5xCV₇₅ = 95,45 μ g/mL; EU 0,1xCV₇₅ = 19,09 μ g/mL; D 2xCV₇₅ = 10 mg/mL; D CV₇₅ = 5 mg/mL; D 0,5xCV₇₅ = 2,5 mg/mL; D 0,1xCV₇₅ = 1,25 mg/mL.

4.5. Comparação entre os resultados obtidos para a epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) e os resultados em humanos

Para avaliar se os dados obtidos para o RHEI poderiam ser extrapolados para humanos, comparamos os resultados obtidos nas menores concentrações testadas com os valores de NOEL (do inglês, *Non observed effect level*) para sensibilizantes testados em humanos obtidos a partir do Teste de Contato Repetitivo em Humanos (HRIPT, do inglês, human repeated insult patch test) (**Tabela 10**) (BASKETTER et al., 2014).

Na **tabela 10** observa-se que as menores concentrações testadas encontram-se abaixo das concentrações descritas para NOEL em humanos. As concentrações utilizadas ainda causaram sensibilização no RHEI, sugerindo, portanto, que os resultados obtidos neste modelo não podem ser extrapolados para humanos.

Tabela 10 – Comparação entre a menor concentração testada na RHEI e as concentrações que não causam sensibilização em humanos de acordo com o Teste de Contato Repetitivo em Humanos (HRIPT)

	Alérgeno (µg/mL)	Volume aplicado (mL)	Area RHE (cm²)	Concentração/ area (µg/cm²) - RHEI	HRIPT (µg/cm²)*	Classif.
DNCB	7,0	0,03	1,12	0,19	8,8	Extremo
NBZ	0,37	0,03	1,12	0,01	Não consta	Extremo
Res	160,0	0,03	1,12	4,29	Não consta	Moderado
Eu	19,09	0,03	1,12	0,51	1938	Fraco

Legenda: DNCB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, NBZ – brometo de 4-nitrobenzilo, R – resorcinol, Eu – eugenol. HRIPT - Teste de Contato Repetitivo em Humanos;

Fonte: *Basketter et al., 2014.

5. DISCUSSÃO

A crescente resistência política e à prática a testes de toxicidade em animais têm impulsionado o desenvolvimento de métodos alternativos para a triagem de substâncias tóxicas, incluindo aquelas que causam hipersensibilidade (GIBBS et al., 2013a).

Durante o desenvolvimento da epiderme seguimos com a realização dos ensaios de citotoxicidade e funcionalidade da linhagem THP-1 após exposição a agentes sensibilizantes e não sensibilizantes. A linhagem THP-1 foi escolhida para este trabalho por ser comercialmente disponível (YOSHIDA et al., 2003) e estar em processo de pré-validação pelo ECVAM para ensaios de sensibilização denominada como *human Cell line Activation test* – h-Clat (MEHLING et al., 2012) devido ao seu potencial de distinção entre compostos sensibilizantes e não sensibilizantes por meio da avaliação da expressão de CD86 e CD54 (MEHLING et al., 2012; SAKAGUCHI et al., 2009). Nosso intuito foi avaliar se a linhagem THP-1 apresentava citotoxicidade e capacidade de distinção de sensibilizantes como demonstrado na literatura. Dessa forma, reproduzimos com sucesso o *h-Clat* em nosso laboratório e comprovamos a qualidade das células com as quais trabalhávamos.

Outro parâmetro que avaliamos nas células THP-1 foi a liberação de IL-8 após exposição a agentes sensibilizantes. Apesar da liberação dessa citocina por células THP-1 ser relatada como um promissor marcador para avaliação de potência de sensibilização (NUKADA et al., 2008), em nossos ensaios, não houve distinção visível entre os sensibilizantes moderado (resorcinol) e fraco (eugenol) apesar de nitidamente observamos o brometo de 4-nitrobenzilo como sensibilizante mais potente entre os sensibilizantes testados. Também não se observou diferença que mostre a potência de sensibilização entre as concentrações testadas de cada sensibilizante.

Após a avaliação da citotoxicidade dos compostos e funcionalidade da THP-1 e, obtenção de um modelo satisfatório de epiderme humana reconstruída satisfatório, foi desenvolvido o modelo de epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI). Modelos 3D de epiderme reconstruída *in vitro* permitem a exposição às substâncias químicas mimetizando a exposição humana (aplicação tópica), e superam todos os inconvenientes da cultura submersa tradicional (CORSINI et al., 2014). Além disso, esses modelos possuem propriedades de barreira e capacidades de metabolização como *in vivo* e, são úteis uma vez que representam a localização da primeira fase de sensibilização da pele quando a substância penetra no estrato córneo e atinge queratinócitos viáveis dentro da epiderme, proporcionando

benefícios significativos sobre modelos de cultura em monocamada para a avaliação do potencial de sensibilização de contato (CORSINI et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2011).

Em nosso modelo, observamos que os compostos na concentração correspondente a IC50 na THP-1 em monocultivo não eram citotóxicos quando em co-cultura epiderme/THP-1 o que demonstra a efetividade da função barreira do estrato córneo e a superioridade do modelo 3D em relação à monocamada para avaliação de toxicidade, sugerindo que este efeito possa ser mais próximo à exposição real. Segundo Ouwehand et al. (2011) é evidente o importante papel exercido pela função de barreira da epiderme, que é importante porque, se o produto químico não pode penetrar no seu interior não irá resultar em sensibilização. Além disso, a aplicação tópica sobre uma epiderme reconstruída abre a possibilidade de testar compostos hidrofóbicos que não podem ser testados em monocamada.

Este efeito também foi observado em trabalhos de outros pesquisadores, utilizando co-cultura de equivalente epidérmico e células da linhagem MUTZ-3, indicando que, no modelo de co-cultura, a epiderme reconstruída fornece uma barreira fisiologicamente relevante para o produto químico com o resultado de que as células imunes são, de fato, expostas a dose de produto químico muito menor do que a que foi aplicada topicamente (OUWEHAND et al., 2011).

A viabilidade apresentada tanto pelo modelo de RHE quanto pela linhagem THP-1 reforça a ideia de que são os mediadores solúveis secretados e não o contato direto do sensibilizante com a THP-1 que causam a sua ativação. A viabilidade da RHE demonstra que a função barreira da epiderme encontra-se íntegra e faz com que o composto passe a ser menos citotóxico para a THP-1 nessa estrutura. Nossos resultados também demonstram que os valores de RFI são importantes apenas para distinguir substâncias sensibilizantes de não sensibilizantes, no entanto, não se modificam conforme o grau de sensibilização sendo incapaz de categorizar os compostos.

A expressão de CD86/CD54 pelas células THP-1 foi maior no *cross talk* do que nas células em monocultivo. Esse resultado demonstra a importância das interações moleculares que podem ser observadas no modelo 3D, mas, estão em falta no modelo em monocultivo o tornando menos expressivo. Esse perfil de resposta é esperado já que os modelos de monocamada 2D não só falham na reprodução de ambientes dinâmicos e complexos de tecidos *in vivo*, mas também podem provocar falsos resultados em algum grau, forçando as células a se adaptarem a uma superfície artificial (BROHEM et al., 2011).

Trabalho de Cao et al. (2012) demonstrou que a co-cultura de THP-1/queratinócitos apresentou maior precisão e sensibilidade em comparação com a THP-1 em monocultivo o que

sugere o papel dos queratinócitos sinalizando “perigo” para LCs na pele por meio de citocinas como IL-1 α , TNF- α e IL-18 que são secretadas pelos queratinócitos após a exposição a sensibilizantes (CAO et al., 2012). A expressão de CD86 e CD54 foi induzida em concentrações menores quando em co-cultura. Propôs-se que a inclusão de queratinócitos aumenta a sensibilidade de moléculas co-estimulatórias em células THP-1 assim como observado neste trabalho. Segundo Cao et al. (2012), a aplicabilidade da célula THP-1 em co-cultura com queratinócitos deve ser mais estudada, bem como a possibilidade de uma classificação de grau usando co-culturas precisa ser avaliada por mais produtos químicos.

Outro fator relevante para a diferença na expressão de CD86 e CD54 na linhagem THP-1 sobre a epiderme imunocompetente é, indiscutivelmente, o fato que temos uma estrutura 3D como "barreira" entre o composto teste e a célula imune, mimetizando o que ocorre no organismo humano e sendo, portanto, mais próximo ao que acontece *in vivo*. Somado a isso, um número crescente de estudos relata diferenças no fenótipo, sinalização celular, migração celular e respostas ao fármaco, quando as mesmas células são cultivadas sob condições de cultura 2D ou 3D (BROHEM et al., 2011).

Segundo Coquette et al. (1999) a expressão e/ou liberação de citocinas por queratinócitos humanos são sinais confiáveis para a previsão de efeitos tóxicos. Dessa forma, diversos estudos têm sido conduzidos baseados na liberação de diversas interleucinas para predição de sensibilização e potência de sensibilização como, por exemplo, a avaliação de IL-18 (GIBBS et al., 2013a) e IL-1 α (TEUNIS et al., 2014). Nesse contexto, avaliamos a liberação de IL-1 α e de IL-8 na RHEI, levando em consideração que tanto as células THP-1 quanto os queratinócitos liberam IL-8 e que IL-1 α é liberada por queratinócitos e tem sido relatada como *endpoint* para determinação de potência de sensibilização. Entretanto, no modelo de RHEI a liberação de IL-8 não se comportou como esperado, não tendo sido observadas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos. Para IL-1 α , houve distinção entre sensibilizantes e não sensibilizantes, mas, não houve uma distinção mais adequada de potência de sensibilização pois, não houve consistência dos resultados e não possuíamos a IC50 em RHE dos compostos sensibilizantes estudados, o que se faz necessário pois, segundo Teunis et al. (2014), a junção dos parâmetros, viabilidade e liberação de IL-1 α , é que pode categorizar os sensibilizantes.

Nosso modelo é fisiologicamente relevante e podem existir mecanismos não identificados de *cross talk* entre a epiderme reconstruída e a THP-1 como a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias que podem ser avaliadas. Além disso, diversos outros estudos

fisiopatológicos deverão contrapor essa problemática, o que deverá no futuro contribuir para a validação de um método ainda mais preciso.

6. CONCLUSÃO

A epiderme humana reconstruída (RHE) imunocompetente gerada neste trabalho apresentou-se funcional e fisiologicamente relevante, demonstrando a importância da função barreira e de modelos que mimetizem o que ocorre *in vivo*. A citotoxicidade dos compostos foi muito menor e a expressão de marcadores de membrana CD86 e CD54 foi aumentada no RHEI quando comparado com a THP-1 em monocultivo, reforçando que modelos 2D são menos próximos do real que os modelos 3D para avaliação de citotoxicidade. Assim, este modelo de RHE imunocompetente apresenta-se promissor para diversos estudos fisiopatológicos, agregando a possibilidade de estudos além dos apresentados como a análise de outras citocinas e análises moleculares.

REFERÊNCIAS

AEBY, P. et al. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. **Toxicology in Vitro**, 2010.

ANDERSON, S. E.; SIEGEL, P. D.; MEADE, B. J. The LLNA: A Brief Review of Recent Advances and Limitations. **Journal of allergy**, v. 2011, p. 424203, 2011.

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

BASKETTER, D. A et al. Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. **Dermatitis**, v. 25, n. 1, p. 11–21, 2014.

BASKETTER, D.; MAXWELL, G. In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 26, n. 4, p. 359–73, 2007.

BERRIDGE, M. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, n. 4, p. 4–9, 1996.

BOUR, H. et al. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 11, p. 3006–3010, 1995.

BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: Concepts and applications. **Pigment Cell and Melanoma Research**, 2011.

CAO, Y. et al. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 34, n. 2, p. 196–204, abr. 2012.

CHAU, D. Y. S. et al. The development of a 3D immunocompetent model of human skin. **Biofabrication**, v. 5, n. 3, p. 35011, set. 2013.

CORSINI, E. et al. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 5, p. 789–796, 2009.

CORSINI, E. et al. Safety evaluation of cosmetic ingredients: In vitro opportunities for the identification of contact allergens. **Cosmetics**, v. 1, n. 1, p. 61–74, 20 mar. 2014.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HOLTZCLAW, W. D.; KENSLER, T. W. The role of Keap1 in cellular protective responses. **Chemical research in toxicology**, v. 18, n. 12, p. 1779–1791, dez. 2005.

DOS SANTOS, G. G. et al. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.02.004>>

DOS SANTOS, G. G. et al. A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 347–357, fev. 2011.

EMTER, R.; ELLIS, G.; NATSCH, A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 245, n. 3, p. 281–290, 2010.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **Journal of Immunology**, v. 109, n. 1, p. 129–35, 1972.

GERBERICK, G. F. et al. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 2, p. 332–343, 2004.

GERBERICK, G. F. et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 2, p. 417–427, 2007.

GERBERICK, G. F. et al. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. **Toxicological Sciences**, v. 112, n. 1, p. 164–174, 2009.

GIBBS, S. et al. Dendritic cell migration assay: A potential prediction model for identification of contact allergens. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 3, p. 1170–1179, abr. 2013.

GUYARD-NICODÈME, M. et al. Development of a multiparametric in vitro model of skin sensitization. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 48–58, 2015.

HARTUNG, T. et al. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, 2004.

KEHREN, J. et al. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 5, p. 779–786, mar. 1999.

KIMBER, I. et al. Chemical allergy: Translating biology into hazard characterization. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. SUPPL.1, 2011.

MEHLING, A. et al. Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. **Archives of Toxicology**, 2012.

NATSCH, A.; EMTER, R. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. **Toxicological sciences**, v. 102, n. 1, p. 110–119, mar. 2008.

NUKADA, Y. et al. Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor-alpha production. **The Journal of toxicological sciences**, v. 33, p. 175–185, 2008.

OECD. **Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. [s.l.] OECD Publishing, 5 fev. 2015a. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en>.

OECD. **OECD / OCDE TG 442D - In Vitro Skin Sensitisation : ARE-Nrf2 Luciferase Test Method**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. [s.l.] OECD Publishing, 5 fev. 2015b. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en>.

OECD. **Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)**. OECD Environmental Health and Safety Publications, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. n. July, 29 jul. 2016.

PEISER, M. et al. Allergic contact dermatitis: Epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2012.

SAINT-MEZARD, P. et al. Allergic contact dermatitis. **European journal of dermatology**, v. 14, n. 5, p. 284–295, 2004.

SAKAGUCHI, H. et al. Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1. **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 9, p. 427–437, fev. 2007.

SAKAGUCHI, H. et al. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test–human cell line activation test (h-CLAT). **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 2, p. 109–126, abr. 2009.

STRICKLAND, J. et al. Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. *Journal of Applied Toxicology*, p. n/a-n/a, jan. 2016.

TEUNIS, M. A. T. et al. International ring trial of the epidermal equivalent sensitizer potency assay: Reproducibility and predictive capacity. **Altex**, v. 31, n. 3, p. 251–268, 2014.

TOEBAK, M. J. et al. Dendritic cells: Biology of the skin. **Contact Dermatitis**, 2009.

URBISCH, D. et al. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 337–351, 2015.

URBISCH, D. et al. Peptide reactivity associated with skin sensitization: The QSAR Toolbox and TIMES compared to the DPRA. **Toxicology in Vitro**, v. 34, p. 194–203, ago. 2016.

WONG, C. L. et al. In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals - opportunities and challenges. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, n. May, p. 94, 2015.

YOSHIDA, Y. et al. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 2, p. 221–228, 2003.

**CAPÍTULO 3 – Papel de citocinas do tipo Th2 e depleção de colesterol na
membrana plasmática no desenvolvimento de um modelo de dermatite
atópica *in vitro***

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dermatite atópica

A dermatite atópica (DA) também comumente conhecida como eczema (TOLLEFSON; BRUCKNER, 2014) é uma doença inflamatória crônica cutânea cada vez mais comum, afetando crianças e adultos em países industrializados (DE BENEDETTO et al., 2016; DE VUYST et al., 2015) e que necessita de terapias eficazes que não estão atualmente disponíveis (NODA et al., 2015). A manifestação clínica da DA geralmente ocorre antes das idades de 1 e 5 anos em 65% e 85% das crianças afetadas, respectivamente (TOLLEFSON; BRUCKNER, 2014).

Esta doença é caracterizada por amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo pele seca, manchas vermelhas, prurido, erupção cutânea e inchaço, cujo curso é cíclico, alternando entre períodos de crise e calma (ROUAUD-TINGUELY et al., 2015). Tais sintomas estão associados principalmente com a função barreira da pele que se apresenta prejudicada em áreas lesionadas e também à diminuição da síntese de proteínas de diferenciação, tais como: citoqueratina 10 (CK10), involucrina (IVL), loricrina (LOR) e filagrina (FLG) (ROUAUD-TINGUELY et al., 2015). Estas alterações permitem a passagem através da epiderme de moléculas de baixo peso molecular com potencial alergênico. Além disto, a predisposição a alterações imunológicas pode levar, por sua vez, a alterações na barreira da pele com consequente desenvolvimento da DA, hipótese esta que foi denominada de “dentro-para-fora” (AHN, 2014). Estas alterações podem resultar em aumento da prevalência de dermatite alérgica de contato (DCA) e infecções microbianas (CZARNOWICKI et al., 2016).

Esta complexa doença envolve interação entre alteração da função barreira epidérmica e uma resposta imune T helper 2 (Th2) anormal (**Figura 17**) (BOGUNIEWICZ; LEUNG, 2011; CORK et al., 2009; KABASHIMA, 2013). A etiologia da DA provavelmente envolve os dois fatores: epidérmicos e imunológico, sendo um responsável pela indução do outro, criando um círculo vicioso em que fatores ambientais e genéticos podem ainda estar envolvidos (BUSSMANN; WEIDINGER; NOVAK, 2011; CORK et al., 2009; LEE et al., 2010). Além disso, a DA é o passo inicial da assim chamada "*atopic march*", que leva cerca de 50 % dos pacientes, particularmente aqueles que sofrem de DA grave, a desenvolver asma e/ou rinite

alérgica durante o seu ciclo de vida (SPERGEL, 2010; ZHENG et al., 2011). A chamada "*atopic march*" pode ter alguma explicação no papel desempenhado pela linfopoietina timo estromal (TSLP), uma citocina produzida na pele com barreira prejudicada e que pode tornar as vias respiratórias hipersensíveis a agentes alérgenos (DEMEHRI et al., 2009; LEYVA-CASTILLO et al., 2013).

Figura 17 – Vias imunológicas da Dermatite Atópica (DA).

Duas abordagens têm fornecido informações importantes sobre o padrão de citocinas expressa na dermatite atópica aguda versus a dermatite atópica crônica. Quando comparada a pele com DA aguda com a pele saudável (não atópica), observa-se um aumento do número de células Th2 que expressa mRNA das interleucinas IL-4 e -13. Quando comparada a pele com DA aguda com a pele com DA crônica, observa-se que a primeira não possui um número significativo de células que expressam mRNA de interferon γ (INF- γ) e IL-12. A DA crônica apresenta menos células que expressam mRNA das interleucinas 4 e 13, mas apresenta um aumento das células que expressam mRNA de interleucina 5 (IL-5), GM-CSF, IL-12 e INF- γ .

Fonte: Adaptado de (LEUNG; BIEBER, 2016)

A DA é considerada uma afecção com resposta de células do tipo Th2 (HVID et al., 2011; NODA et al., 2015) relacionada com expressão elevada de citocinas associadas à Th2 e de IgE (HVID et al., 2011) e, até agora, a caracterização da doença, mesmo em populações diferentes, mostrou que os seus mecanismos são semelhantes (NODA et al., 2015). A DA é caracterizada por super expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-4 e IL-13 (Th2-citocinas) (ROUAUD-TINGUELY et al., 2015) e estudos demonstram que a IL-25 produzida por células dendríticas (DCs) pode ter duplo papel tanto como indutor da resposta Th2 quanto

inibidor da síntese de filagrina, afetando diretamente a função barreira da pele em pacientes com DA (HVID et al., 2011).

A DA é um problema de saúde crescente e, portanto, o desenvolvimento de modelos que permitam estudar essa doença e avaliar abordagens preventivas e/ou terapêuticas faz-se necessário (DE VUYST et al., 2016). Somado a isso, regulamentações como a da União Europeia (Regulamento (CE) n.º 1223/2009) que proíbem os testes de produtos cosméticos em animais e sua comercialização se testado em animais fora da EU, reforçam a necessidade do desenvolvimento de metodologias alternativas aos testes em animais. Nesse contexto, a epiderme humana reconstruída (RHE) tem-se mostrado como uma alternativa confiável para alguns estudos de propriedades de barreira da pele. De fato, o RHE mimetiza a epiderme *in vivo* em termos de histologia, distribuição de marcadores de diferenciação, e funcionalidade de barreira (DE VUYST et al., 2014; FRANKART et al., 2012; POUMAY et al., 2004). Nesse sentido, o RHE pode ser facilmente desafiado, a fim de criar condições patológicas encontradas em nível epidérmico (DE VUYST et al., 2014).

A metil- β -ciclodextrina (M β CD) pode extrair o colesterol das membranas plasmáticas dos queratinócitos, interrompendo, assim, microdomínios lipídicos organizados por colesterol. Em particular, o grupo de pesquisas liderado pelo Prof. Poumay demonstrou que as mudanças induzidas pela depleção do colesterol em queratinócitos mimetizam o perfil de transcrição observado nos queratinócitos de pacientes com lesões de DA (DE VUYST et al., 2015; MATHAY et al., 2011), e tal perfil pode ser reproduzido em modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) *in vitro* (DE VUYST et al., 2016).

Recentemente, o grupo demonstrou que a depleção de colesterol atua sinergicamente com as citocinas do tipo Th2-relacionadas (IL-4, IL-13 e IL-25) mimetizando *in vitro* as características morfológicas (**Figura 18**) e de função barreira da dermatite atópica (DE VUYST et al., 2016). Isto inclui o enfraquecimento da barreira lipídica, bem como as alterações histológicas típicas e de sinalização (DE VUYST et al., 2016). No entanto, nesses estudos para modelagem de DA *in vitro*, o papel respectivo de cada IL e as consequências dessa combinação com a depleção de colesterol na membrana plasmática ainda não foram completamente compreendidos.

Figura 18 – Comparação entre cortes histológicos obtidos a partir de biópsias de (A) pele saudável e (B) pele com dermatite atópica, e, (C) Epiderme Humana Reconstruída (RHE) tratado por 2 horas com M β CD, seguido por tratamento com IL-4, IL-13 e IL-25 (IL MIX) por 48 h demonstrando que apresenta as características morfológicas da dermatite atópica (DA) *in vivo*. É possível observar que o RHE-DA apresenta características presentes na pele humana atópica como por exemplo, hipogranulose, espongirose e diminuição do estrato córneo. Barras de escala = 50 μ m.

Fonte: De Vuyst et al., 2016

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o papel das citocinas do tipo Th2-relacionadas, IL-4, IL-13 e IL-25, e da depleção de colesterol na membrana plasmática (DCMP) de queratinócitos humanos primários no desenvolvimento das características moleculares e morfológicas da dermatite atópica (DA) em um modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfolologicamente o papel das interleucinas e da DCMP no desenvolvimento das características da DA *in vitro*;
- Avaliar a integridade da função barreira do RHE exposto a interleucinas e DCMP isoladamente ou combinados;
- Analisar a expressão gênica e perfil de transcrição do RHE exposto a interleucinas e DCMP isoladamente ou combinados;

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura de células e produção da epiderme humana reconstruída (RHE)

Amostras de pele de seres humanos adultos normais foram obtidas a partir de abdominoplastias (Dr. B. Bienfait, Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Bélgica) após aprovação do comitê de ética local. Os queratinócitos epidérmicos foram isolados e cultivados como descrito anteriormente (DE VUYST et al., 2014; FRANKART et al., 2012; POUMAY et al., 2004). Para a produção da epiderme humana reconstruída (RHE), queratinócitos foram cultivados submersos em um inserto de policarbonato (Milipore, Bélgica) por 24 h antes de serem expostos a interface ar-líquido por 11 dias. No 11º dia, o RHE era tratado ou não com metil- β -ciclodextrina 7,5 mM (Sigma-Aldrich, Bélgica) por 2h e exposto ou não às interleucinas IL-4 50 ng/mL, IL-13 50 ng/mL, IL-25 20 ng/mL (Peprotech, Reino Unido), individualmente ou combinadas (IL MIX) nas mesmas concentrações de quando utilizadas isoladamente (DE VUYST et al., 2016).

3.2. Avaliação morfológica e imunofluorescência

As amostras de RHE foram fixadas em solução formol:ácido acético:álcool:água (10:5:70:15) por 24 h e em seguida, processadas para inclusão em parafina. Após processamento, foram obtidas secções de 6 μ m e coradas com hemalun e eritrosina (HE) para análise morfológica. Para a detecção por imunofluorescência utilizou-se o anticorpo anti-anidrase carbônica II (CA2) (anticorpo de coelho, (1: 100) Sigma-Aldrich, Bélgica) e anti-loricrina (LOR) (anticorpo de coelho, (1: 100); Abcam, Reino Unido). As amostras de tecido foram incubadas durante uma hora com anticorpo secundário IgG Alexa 488 anti-coelho conjugado (Life Technologies, EUA). Os anticorpos secundários foram diluídos 1:100 e as imagens obtidas utilizando microscopia de epifluorescência (DE VUYST et al., 2016).

3.3. Avaliação de função barreira do modelo por meio de avaliação de resistência elétrica trans-epitelial (TEER) e da permeação ao corante lucifer yellow (LY)

Alterações na TEER foram avaliadas utilizando o equipamento Milicel electrical resistance (Merk-Milipore, Bélgica). Para avaliação da permeação do corante fluorescente lucifer yellow através do RHE, aplicou-se topicamente 150 µL de lucifer yellow a 1 mM (diluído em PBS) e incubou-se as amostras por 6 h em estufa 5 % de CO₂ a 37° C. Após esse período, o meio abaixo da epiderme foi coletado para placa de 96 poços e a fluorescência medida em leitor de ELISA (λ_{ex} : 485nm; λ_{em} : 535nm) (DE VUYST et al., 2016).

3.4. Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR

O RNA total foi extraído a partir de RHE usando NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Alemanha) e convertido em cDNA utilizando-se o kit Superscript II RNase H-reverse (Invitrogen, Bélgica). A amplificação foi realizada utilizando o FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Suíça) em equipamento Luz Cycler® 96 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Alemanha). Os genes foram normalizados para o gene de referência RPLP0 (MINNER; POUMAY, 2009), enquanto que os primers (Eurogentec, Bélgica) foram utilizados a uma concentração de 300 nM, com as sequências (**Tabela 11**) e as condições de reação realizadas como descrito anteriormente (DE VUYST et al., 2016). Os dados foram analisados usando o método quantitativo $\Delta\Delta C_q$ e os intervalos de confiança 95 % foram calculados usando análise de variância de duas vias (DE VUYST et al., 2015).

Tabela 11 – Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-qPCR

Gene	Foward (5'-3')	Reverse
RPLP0	ATCAACGGGTACAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
FLG-1	GGGCACTGAAAGGC AAAAAG	CACCATAATCATAATCTGCACTACCA
LOR	TCATGATGCTACCCGAGGTTTG	CAGAACTAGATGCAGCCGGAGA
HAS3	GCCCTCGGCGATTTCG	TGGATCCAGCACAGTGTGTCAGA
CAII	AACAATGGTCATGCTTTCAACG	TGTCCATCAAGTGAACCCAG
FLG2	ACCAGGTTCACTTAAACTTGCA	ATGACATCCACTGTGTCTGGATC
NELL2	TAAGGGTATAATGCAAGATGTCCAA TT	AGATCTGGGCACTGAGCAATAAA
TSLP	CGCGTCGCTCGCCAAAGAAA	TGAAGCGACGCCACAATCCTTG
HB-EGF	TGGCCCTCCACTCCTCATC	GGGTCACAGAACCATCCTAGC

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos morfológicos do uso das interleucinas IL-4, IL-13 e IL-25 e depleção de colesterol na membrana plasmática dos queratinócitos na epiderme humana reconstruída (RHE)

A fim de avaliar os efeitos individuais ou em conjunto das interleucinas e da depleção de colesterol na membrana plasmática (DCMP), RHEs foram tratados ou não com metil- β -ciclodextrina (M β CD) por 2 h para obtenção de DCMP, em seguida, incubados por 48h com IL-4, IL-13, IL-25, ou com uma mistura destas interleucinas (IL MIX). A **Figura 15** ilustra que a histologia do RHE é principalmente afetada pela combinação de incubação com M β CD seguida por IL-4. Tais alterações são muito semelhantes quando observamos os efeitos do RHE tratado M β CD seguida por IL MIX. Uma forte influência também é observada quando a DCMP é seguida de incubação do RHE com IL-13. Por outro lado, a incubação de RHE com IL-25, após DCMP ou não, não resulta em alterações histológicas aparentes. Como pode-se observar na **figura 19** a incubação com IL-4 reduz a espessura do estrato córneo. Além disso, quando M β CD é combinado com IL-4 ou IL-13, a camada granular, é fortemente alterada ficando quase ausente.

Figura 19 – Alterações morfológicas do RHE após os tratamentos.

Epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX). Os cortes histológicos são representativos de três experimentos independentes, utilizando queratinócitos de pacientes diferentes para preparo do RHE. Barra = 20 μm.

4.2. Alterações na função barreira do RHE

As alterações na função de barreira foram avaliadas por meio das técnicas de resistência elétrica trans-epitelial (TEER) ou por permeação ao corante “lucifer yellow” (LY). A TEER diminui principalmente quando os RHEs foram tratados com IL-4. Além disso, também foram observadas contribuições significativas de IL-13 e IL-25, entretanto sem qualquer redução adicional quando combinadas ($p > 0,05$) (**Figura 20A**). As reduções na TEER foram observadas independentemente de DCMP. Por outro lado, os estudos de permeabilidade de função barreira utilizando o corante fluorescente LY indicam que IL-4 possui um importante papel para aumento da permeabilidade da função barreira, mas esses efeitos são elevados quando há a combinação de DCMP com o uso de IL MIX (**Figura 20B**).

Figura 20 – Avaliação da função barreira do RHE.

Epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX). A) Medidas da resistência elétrica trans-epidermal (TEER) em RHE (n=3). B) Permeabilidade ao corante lucifer yellow em RHE. (A) e (B) representam três experimentos independentes onde cada barra corresponde a média ± desvio padrão (n=3). Dados analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni. *p < 0.05 e ***p < 0.001. Cada medida foi comparada em relação ao controle (-MβCD) e sua significância estática está representada entre parênteses, enquanto que comparações estatísticas entre amostras estão representadas por ligantes.

4.3. Avaliação da expressão da anidrase carbônica II

Após os tratamentos como descrito no item 4.1, que incluíam DCMP ou não, seguida por exposição a interleucinas individualmente ou combinadas (IL MIX), a expressão de anidrase carbônica II (CA2) na RHE foi analisada utilizando-se as técnicas de imunofluorescência (**Figura 21**) e de RT-qPCR. CA2 aparece superexpresso principalmente quando o RHE é tratado com IL-4 e IL-13, com um sutil aumento após incubação com IL-25.

Os efeitos observados são mais elevados após DCMP e significativamente aumentados quando combinados DCMP seguido por exposição a IL-4 (**Figuras 21 e 22**). No entanto, tanto IL-4 quanto IL-13 indicam indução significativa da expressão do gene CA2 quando se olha para os níveis relativos transcritos (**Figura 23**).

Figura 21 – Imunofluorescência para avaliação da expressão de anidrase carbônica II em RHE. Epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX) e, após inclusão em parafina, analisadas por imunofluorescência. Análise por imunofluorescência da expressão de anidrase carbônica II (CA2) onde CA2 aparece em verde e os núcleos em azul (Hoechst 33258). Barra de escala = 20 μm. As imagens são representativas de três experiências independentes.

Figura 22 – Intensidade de fluorescência após a marcação com anticorpo anti-CA2

Epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+ MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX). Em seguida, as amostras foram analisadas por imunofluorescência para anidrase carbônica II (CA2). O experimento representa três experimentos independentes (n=3). O controle negativo (NegCTRL) corresponde as amostras que receberam apenas anticorpos secundários. A intensidade do sinal de detecção foi medida usando o software de análise de imagem fornecida com o microscópio Olympus BX63 e expressa em pixels/μm². Os valores médios representam as medidas de três experimentos independentes.

Figura 23 – Avaliação da expressão gênica de anidrase carbônica II (CA2) em RHE

A expressão relativa de CA2 mRNA foi avaliada por RT-qPCR em epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX). As barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. *p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001

4.4. Avaliação dos marcadores de integridade de barreira epidérmica, loricrina (LOR) e filagrina (FLG)

Na **figura 24** observamos os efeitos dos tratamentos realizados nos níveis de expressão de loricrina (LOR) por meio da técnica de imunofluorescência. Os resultados de expressão de LOR na RHE indicam que, a depleção de colesterol na membrana plasmática (DCMP) seguida por tratamento do RHE com IL-4, gera uma perda visível e reprodutível da expressão de LOR (**Figura 24**). Entretanto, a expressão relativa de mRNA não demonstra uma perda significativa da expressão desta proteína (**Figura 25a**), o que pode ser explicado devido ao fato da expressão gênica ocorrer num tempo inferior a 48h. Os níveis de LOR mRNA encontram-se alterados em após 24 h, mas o mesmo não pode ser observado após 48 h de tratamento.

A filagrina (FLG) é uma proteína de diferenciação epidérmica cuja expressão é regulada negativamente na dermatite atópica, de maneira bastante semelhante a LOR (KIM et al., 2008; PELLERIN et al., 2013; THYSEN; KEZIC, 2014). Após o tratamento com M β CD por 2h seguido por tratamento com as interleucinas por 48 h, os níveis de expressão de FLG-1 mRNA e FLG-2 mRNA são reduzidos de forma estatisticamente significativa quando o tratamento é seguido por exposição a IL-25 e IL MIX (**figura 25b e 25c**).

Figura 24 – Imunofluorescência para avaliação da expressão de loricrina em RHE. Epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX) e, após inclusão em parafina, analisadas por imunofluorescência. Análise por imunofluorescência da expressão de loricrina (LOR) onde LOR aparece em verde e os núcleos em azul (Hoechst 33258). Barra de escala = 100 μm. As imagens são representativas de três experimentos independentes.

Figura 25 – Avaliação da expressão gênica de marcadores de diferenciação epidérmica expressos nas camadas superiores da epiderme.

Expressão relativa de mRNA avaliada por RT-qPCR em epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX). As barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. (A) Loricrina (LOR); (B) Filagrina-1 (FLG-1) e (C) Filagrina-2 (FLG-2). *p < 0,05 e ** p < 0,01.

4.5. Avaliação da expressão gênica de marcadores genéticos comumente alterados na dermatite atópica

Para a avaliação da expressão gênica dos marcadores genéticos comumente alterados na dermatite atópica, a saber, NELL2 (*neural epidermal growth factor like 2*), hialuronan sintase 3 (HAS3), Linfopoetina estromal tímica derivada de queratinócitos (TSLP) e Fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina (HB-EGF), utilizamos a técnica de RT-qPCR.

A expressão de NELL2 mRNA apresentou-se aumentada após incubação com IL-4 ou IL-13, independentemente de DCMP. Nenhum efeito aditivo foi observado quando ambos estão presentes, como por exemplo no RHE tratado com IL MIX com ou sem DCMP (**Figura 26A**).

O ácido hialurônico (HA) encontra-se aumentado nas doenças inflamatórias cutâneas e estudos anteriores demonstraram que a hialuronan sintase 3 (HAS3), uma enzima responsável pela síntese epidérmica de HA, a qual é positivamente regulada na dermatite atópica, bem como em queratinócitos primários em cultura quando a DCMP precede a exposição ao mix de interleucinas na RHE (DE VUYST et al., 2016; MALAISSE et al., 2014; OHTANI et al., 2009). Os dados ilustrados na **Figura 26B** indicam que o aumento da expressão de relativa HAS3 mRNA ocorre, principalmente, devido a combinação DCMP e exposição a IL-4, embora somente o emprego de IL MIX produza uma indução estatisticamente significativa.

Finalmente nas condições aqui estudadas, os níveis de expressão dos genes de TSLP e HB-EGF não foram significativamente afetados no período avaliado (2 h de incubação com MβCD seguido por 48 h de exposição as interleucinas), entretanto a estudos demonstram o aumento da expressão desses genes após um período menor (cerca de 6h) de incubações com citocinas Th2 (**Figuras 26C e 26D**) (DE VUYST et al., 2015, 2016).

Figura 26 – Avaliação da expressão gênica de marcadores de dermatite atópica.

Expressão relativa de mRNA avaliada por RT-qPCR em epiderme humana reconstruída (RHE) tratada (+MβCD) ou não (-MβCD) por 2 horas com MβCD e cultivadas ou não por 48 h com IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), isoladamente ou em conjunto (IL MIX). As barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. (A) *Neural epidermal growth factor-like 2* (NELL2); (B) Hialuronan sintase 3 (HAS3); (C) linfopoiatina estromal tímica (TSLP) e (D) Fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina (HB-EGF) de mRNA de ligação à heparina. Três experimentos independentes foram realizados. As barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. Análise de variância de duas vias foi realizada, seguida por testes de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Cada medida foi comparada em relação ao controle (-MβCD) e sua significância estática está representada entre parênteses, enquanto que comparações estatísticas entre amostras estão representadas por ligantes.

5. DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores demonstrou-se os efeitos da depleção de colesterol na membrana plasmática (DCMP) em queratinócitos em monocamada [6] e em RHE quando combinado com um MIX de interleucinas (IL-4, IL-13 e IL-25) promovendo em tal modelo as características típicas da dermatite atópica (DA) *in vitro* (DE VUYST et al., 2016). O presente estudo dedicou-se a identificar os papéis individuais de cada interleucina na criação de tais características quando combinadas ou não com DCMP.

Estudos anteriores têm demonstrado que a depleção de colesterol na membrana plasmática de queratinócitos é suficiente para induzir alterações significativas na sinalização celular e nos níveis de expressão de determinados genes (DE VUYST et al., 2015), incluindo a expressão de TSLP que poderia resultar na produção de interleucinas pelas células T (DE VUYST et al., 2016). Assim, devido a ausência de células imunes no modelo estudado neste trabalho, fez-se necessária a adição de interleucinas exógenas para indução de alterações significativas no RHE, como função barreira e histologia.

As alterações morfológicas no modelo de dermatite atópica ocorrem por ação da combinação de citocinas Th2-relacionadas na RHE e, são significativas, quando combinadas com DCMP. A espongiose é ainda aumentada após DCMP de queratinócitos incorporados ao RHE (DE VUYST et al., 2016). O aparecimento de espongiose epidérmica, uma das principais características de lesões eczematosas em equivalentes de pele, pode ser induzida por IL-4 e IL-13 (DANSO et al., 2014; KAMSTEEG et al., 2011).

Neste trabalho demonstramos que a DCMP contribui com a IL-4 para o aparecimento de espongiose no modelo de RHE, diminuindo simultaneamente a espessura do estrato córneo e induzindo hipogranulose (diminuição da camada granulosa da epiderme), duas outras características morfológicas da DA. Somado a isso, os ensaios de avaliação de função barreira do RHE demonstraram que a redução da função barreira acontece em maior parte devido a ação de IL-4. Além disso, IL-13 combinados com a DCMP, ou IL-25 por si só, também reduzem significativamente a resistência elétrica trans-epitelial (TEER).

De acordo com estudos de permeação ao corante lucifer yellow (PLY), as alterações máximas observadas na permeabilidade da função barreira ocorrem quando o tratamento com IL MIX é precedido por DCMP, indicando o potencial efeito aditivo da ruptura dos domínios lipídicos da membrana. A literatura relata que IL-4 e IL-13, mas não IL-25, têm sido

demonstrados como responsáveis pela ruptura da barreira no epitélio das vias respiratórias humanas, com efeito máximo atribuído à IL-4 (SAATIAN et al., 2013).

A loricirina (LOR) encontra-se localizada em queratinócitos granulares na epiderme normal, e a sua redução é observada na pele atópica lesionada e não lesionada, assim como em RHE expostos a IL-4 e IL-13 (KIM et al., 2008). A detecção de LOR por imunofluorescência neste estudo demonstrou uma diminuição importante somente quando a DCMP foi realizada antes da incubação do RHE com IL-4 (**Figura 15** e (DE VUYST et al., 2016)).

A redução de expressão de filagrina (FLG) está ligada com distúrbios na diferenciação epidérmica, alterações na composição e organização da barreira lipídica, redução nos fatores de hidratação naturais e aumento da permeabilidade (HÖNZKE et al., 2016). Vários estudos têm demonstrado uma expressão reduzida de filagrina como consequência da exposição dos queratinócitos a citocinas do tipo Th2 (DE VUYST et al., 2016; HOWELL et al., 2007; HVID et al., 2011; KIM et al., 2013), atuando em ambos os níveis de expressão (FLG-1 e FLG-2).

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que estas citocinas requerem DCMP prévia, a fim de reduzir significativamente os níveis de FLG-1 e FLG-2 mRNA. No entanto, quando estas citocinas são utilizadas individualmente, nenhuma redução significativa nos níveis de expressão de FLG-1 ou FLG-2 mRNA pode ser observado, ao contrário das observações realizadas após exposição a IL MIX (**Figura 25B e C**).

A expressão gênica de CA2 e NELL2 é super-regulada na DA, e embora nenhum papel fisiopatológico tenha sido atribuído até o momento (KAMSTEEG et al., 2007, 2011), ambos os genes mostraram-se regulados positivamente neste modelo (DE VUYST et al., 2016). No entanto, nossos dados sugerem que DCMP antes da incubação do RHE com IL-4 proporciona maior expressão do gene CA2. Em relação à regulação de NELL2, Th2-citocinas (IL-4 e IL-13) exercem papel importante, mas sem qualquer efeito aditivo quando combinadas ou após DCMP.

A pele dos pacientes com DA expressa HB-EGF, que por sua vez pode modular a expressão de genes de HAS1 e HAS3 (MALAISSE et al., 2014). Além disso, estudos realizados em RHE revelaram que HB-EGF aumenta de maneira dose-dependente a expressão de HAS3 (MALAISSE et al., 2014). Neste estudo, não se observou qualquer aumento significativo na expressão de HB-EGF, enquanto que a expressão de HAS3 foi induzida principalmente por IL-4 após DCMP. Os níveis de expressão de HB-EGF são aumentados em queratinócitos exclusivamente durante as primeiras horas que se seguem DCMP, mas não após 48 horas de tratamento (DE VUYST et al., 2015; GILTAIRE; LAMBERT; POUMAY, 2011; MATHAY et al., 2011).

A ausência de variação na expressão do gene TSLP provavelmente ocorre por um fenômeno semelhante. Com efeito, ao passo que a DCMP aumenta significativamente os níveis de expressão TSLP por algumas horas (DE VUYST et al., 2016), tem sido relatado que IL-4 e IL-13 sozinhos não podem estimular a expressão de TSLP, mas requerem a exposição combinada a TNF- α ou IL-1 α , a fim de chegar a uma indução significativa (BOGIATZI et al., 2007). Além disso, IL-25 desempenharia um papel duplo no DA, induzindo diferenciação Th2 (WANG et al., 2007), mas também inibindo a expressão de filagrina nos queratinócitos, afetando assim, a barreira cutânea em pacientes com DA (HVID et al., 2011). Assim, atuando tanto em células do sistema imunológico quanto epidérmicos na pele, a IL-25 pode fornecer, em colaboração com TSLP alguma explicação para a ligação observada entre a inflamação e ruptura da barreira em DA lesionada (DELEURAN et al., 2012).

É de fato bem conhecido que na DA, existem interações complexas entre a disfunção da barreira cutânea e inflamação. Por exemplo, arranhões na pele alteram a sua barreira e, assim, induzem a inflamação cutânea, enquanto que, inversamente, a reparação da barreira é capaz de diminuir o prurido em conjunto com a inflamação cutânea local (DRAELOS, 2012; SUGARMAN; PARISH, 2009; VALDMAN-GRINSHPOUN; BEN-AMITAI; ZVULUNOV, 2012). A regulação positiva de citocinas Th2 em pele atópica diminui a síntese epidérmica de peptídeos antimicrobianos por exemplo, contribuindo para o aumento da susceptibilidade dos pacientes com DA para a colonização bacteriana e superinfecção da pele, o que agrava a inflamação (CLAUSEN et al., 2016; NOMURA et al., 2003; POWERS et al., 2015).

Finalmente, a ativação dos queratinócitos via depleção de colesterol na membrana plasmática (MATHAY et al., 2011) ou via estimulação exógena por meio de interleucinas (BERNARD et al., 2012; DANSO et al., 2014; KAMSTEEG et al., 2011) podem produzir alterações epidérmicas relatadas na DA. Muito provavelmente, a ativação de queratinócitos por DCMP causa alterações na sinalização celular através de desorganização de microdomínios lipídicos específicos neste tipo celular (Monte et al., 2016 submetido). Os dados atuais e trabalhos anteriores (DE VUYST et al., 2015, 2016; MALAISSE et al., 2014; MATHAY et al., 2011) sugerem que os microdomínios lipídicos influenciam a sinalização epidérmica, contribuindo assim com a IL-4 para alterar o fenótipo dos queratinócitos, potencialmente em todas as camadas da epiderme.

Ambas interleucinas, IL-4 e IL-13, atuam em queratinócitos através dos receptores de IL-4R α /IL-13R α 1 (AKAIWA et al., 2001), que provavelmente desempenham um papel importante enquanto estão regulados positivamente em doenças inflamatórias crônicas como a psoríase e a DA (WONGPIYABOVORN et al., 2003). Curiosamente, receptores IL-13R α 2, IL-

13R α 1 e IL-4R α são regulados positivamente em queratinócitos após DCMP (MATHAY et al., 2011), indicando que o colesterol pode também regular a sinalização celular através destes receptores, talvez devido à localização dentro microdomínios lipídicos.

Em relação a IL-25, a expressão desta citocina, assim como dos seus receptores, é aumentada em DA lesionada, mas não em doenças da pele mediadas por células Th1, o que implica as funções específicas durante a inflamação alérgica (WANG et al., 2007). Interessantemente, a expressão do gene foi regulada positivamente em todos os queratinócitos incubadas com M β CD para todos os receptores, incluindo IL-13R α 2, IL-13R α 1, IL-4R α e de IL-17RA (subunidade do receptor de IL-25) (MATHAY et al., 2011), indicando que microdomínios lipídicas contendo colesterol poderiam regular a sinalização através destes receptores (KABOURIDIS et al., 2000; LINGWOOD; SIMONS, 2010).

Compreender o papel das interleucinas em doenças epidérmicas não é uma tarefa fácil. Concentrações epidérmicas precisas são na sua maioria desconhecidos e efeitos pleiotrópicos redundantes de interleucinas dificultam a análise. Além disso, são observados efeitos sinérgicos, como por exemplo, IL-17 amplifica a ativação de queratinócitos por IL-4 (ALBANESI et al., 2000).

6. CONCLUSÃO

Ambas interleucinas, IL-4 e IL-13, induzem perfis de resposta bastante semelhantes na epiderme humana reconstruída (RHE) na maioria das condições testadas, entretanto sua combinação, não produz efeitos aditivos neste modelo. Isto pode ser explicado pela sinalização através de receptores comuns. Uma contribuição significativa de IL-25 após DCMP reduz a expressão FLG foi relatada neste trabalho com simultânea diminuição da resistência elétrica trans-epitelial (TEER). No entanto, as principais alterações que mimetizam o perfil inflamatório e morfológico da dermatite atópica *in vitro* no modelo de RHE ocorrem principalmente após incubação dos queratinócitos epidérmicos com IL-4 após DCMP.

REFERÊNCIAS

AHN, K. The role of air pollutants in atopic dermatitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 134, n. 5, p. 993–9; discussion 1000, nov. 2014.

AKAIWA, M. et al. Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. **Cytokine**, v. 13, n. 2, p. 75–84, jan. 2001.

ALBANESI, C. et al. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 115, n. 1, p. 81–87, 2000.

BERNARD, F.-X. et al. Keratinocytes under Fire of Proinflammatory Cytokines: Bona Fide Innate Immune Cells Involved in the Physiopathology of Chronic Atopic Dermatitis and Psoriasis. **Journal of allergy**, v. 2012, p. 718725, 2012.

BOGIATZI, S. I. et al. Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. **Journal of immunology**, v. 178, n. 6, p. 3373–3377, mar. 2007.

BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis: A disease of altered skin barrier and immune dysregulation. **Immunological Reviews**, v. 242, n. 1, p. 233–246, 2011.

BUSSMANN, C.; WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Genetics of atopic dermatitis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 9, n. 9, p. 670–676, set. 2011.

CLAUSEN, M.-L. et al. In vivo expression of antimicrobial peptides in atopic dermatitis. **Experimental dermatology**, v. 25, n. 1, p. 3–9, jan. 2016.

CORK, M. J. et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 8, p. 1892–1908, ago. 2009.

CZARNOWICKI, T. et al. Petrolatum: Barrier repair and antimicrobial responses underlying this “inert” moisturizer. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1091–1102.e7, 2016.

DANSO, M. O. et al. TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 7, p. 1941–1950, jul. 2014.

DE BENEDETTO, A. et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 127, n. 3, p. 773–786.e7, 9 out. 2016.

DE VUYST, E. et al. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. **Methods in molecular biology**, v. 1195, p. 191–201, 2014.

DE VUYST, E. et al. The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures. **Archives of dermatological research**, v. 307, n. 4, p. 309–318, maio 2015.

DE VUYST, E. et al. MbetaCD concurs with IL-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. **Experimental dermatology**, jun. 2016.

DELEURAN, M. et al. IL-25 induces both inflammation and skin barrier dysfunction in atopic dermatitis. **Chemical Immunology and Allergy**, 2012.

DEMEHRI, S. et al. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. **PLoS Biology**, v. 7, n. 5, 2009.

DRAELOS, Z. D. New treatments for restoring impaired epidermal barrier permeability: Skin barrier repair creams. **Clinics in Dermatology**, 2012.

FRANKART, A. et al. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. **Experimental dermatology**, v. 21, n. 11, p. 871–875, nov. 2012.

GILTAIRE, S.; LAMBERT, S.; POUMAY, Y. HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways. **Journal of cellular physiology**, v. 226, n. 6, p. 1651–1659, jun. 2011.

HÖNZKE, S. et al. Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and -Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 3, p. 631–639, 2016.

HOWELL, M. D. et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 150–155, 2007.

HVID, M. et al. IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 1, p. 150–157, 2011.

KABASHIMA, K. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. **Journal of dermatological science**, v. 70, n. 1, p. 3–11, abr. 2013.

KABOURIDIS, P. S. et al. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. **European journal of immunology**, v. 30, p. 954–963, 2000.

KAMSTEEG, M. et al. Increased expression of carbonic anhydrase II (CA II) in lesional skin of atopic dermatitis: regulation by Th2 cytokines. **The Journal of investigative dermatology**, jul. 2007.

KAMSTEEG, M. et al. Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 5, p. 2091–2099, 2011.

KIM, B. E. et al. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. **Clinical Immunology**, v. 126, n. 3, p. 332–337, 2008.

KIM, B. E. et al. IL-25 enhances HSV-1 replication by inhibiting filaggrin expression, and acts synergistically with Th2 cytokines to enhance HSV-1 replication. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 12, p. 2678–2685, dez. 2013.

LEE, E. B. et al. Increased serum thymic stromal lymphopoietin in children with atopic dermatitis. **Pediatric allergy and immunology**, v. 21, n. 2, p. e457-60, 2010.

LEUNG, D. Y. M.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **The Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151–160, 9 out. 2016.

LEYVA-CASTILLO, J. M. et al. TSLP Produced by Keratinocytes Promotes Allergen Sensitization through Skin and Thereby Triggers Atopic March in Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 1, p. 154–163, 2013.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 46–50, 2010.

MALAISSSE, J. et al. Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 8, p. 2174–2182, ago. 2014.

MATHAY, C. et al. Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 1, p. 46–58, 2011.

MINNER, F.; POUMAY, Y. Candidate housekeeping genes require evaluation before their selection for studies of human epidermal keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, mar. 2009.

NODA, S. et al. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 136, n. 5, p. 1254–1264, 2015.

NOMURA, I. et al. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: A gene microarray analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 6, p. 1195–1202, 2003.

OHTANI, T. et al. Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 6, p. 1412–1420, 2009.

PELLERIN, L. et al. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 1094–1102, 2013.

POUMAY, Y. et al. A simple reconstructed human epidermis: Preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. **Archives of Dermatological Research**, v. 296, n. 5, p. 203–211, out. 2004.

POWERS, C. E. et al. Microbiome and pediatric atopic dermatitis. **Journal of Dermatology**, 2015.

ROUAUD-TINGUELY, P. et al. From the morphological to the transcriptomic characterization of a compromised three-dimensional in vitro model mimicking atopic dermatitis. **The British n**, v. 173, n. 4, p. 1006–1014, out. 2015.

SAATIAN, B. et al. Interleukin-4 and interleukin-13 cause barrier dysfunction in human airway epithelial cells. **Tissue barriers**, v. 1, n. 2, p. e24333, abr. 2013.

SPERGEL, J. M. Epidemiology of atopic dermatitis and atopic March in children. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, 2010.

SUGARMAN, J. L.; PARISH, L. C. Efficacy of a lipid-based barrier repair formulation in moderate-to-severe pediatric atopic dermatitis. **Journal of drugs in dermatology**, v. 8, n. 12, p. 1106–11, 2009.

THYSSEN, J. P.; KEZIC, S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2014.

TOLLEFSON, M. M.; BRUCKNER, A. L. Atopic Dermatitis: Skin-Directed Management. **Pediatrics**, 2014.

VALDMAN-GRINSHPOUN, Y.; BEN-AMITAI, D.; ZVULUNOV, A. Barrier-restoring therapies in atopic dermatitis: Current approaches and future perspectives. **Dermatology Research and Practice**, 2012.

WANG, Y.-H. et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 8, p. 1837–1847, 2007.

WONGPIYABOVORN, J. et al. Up-regulation of interleukin-13 receptor 1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, n. 1, p. 31–40, 2003.

ZHENG, T. et al. The atopic march: Progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, 2011.

**CAPÍTULO 4 – Epiderme humana reconstruída (RHE) como plataforma
de testes para avaliação de fotoimunossupressão**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta pode ser dividida em UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm) (Amaro-Ortiz et al., 2014). A mais lesiva à integridade genética é a UVC, no entanto, esta raramente atinge a pele humana devido a sua absorção por camadas de ozônio. A radiação UVC tem o comprimento de onda mais curto e o maior valor de energia. A UVA possui o comprimento de onda mais longo e com menor energia podendo penetrar profundamente na derme e causar fotoenvelhecimento. Entre o comprimento de onda da UVC e da UVA, está a UVB, que só é parcialmente bloqueada por nuvens ou neblina. A UVB pode causar a vermelhidão da pele e contribui para a maior parte da radiação UV que entra na derme, além de ser considerada a principal causa de queimaduras solares e câncer de pele (**Figura 27**) (LEE et al., 2013).

A radiação UVB (290-320 nm) é considerada o mais importante fator de risco ambiental para o câncer de pele (RANGWALA; TSAI, 2011). Ela é capaz de aumentar os níveis das interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, da proteína quimioatrativa de monócitos (MCP)-1, do fator de necrose tumoral e expressão de genes TNF- α em queratinócitos (Monfrecola et al., 2013). A UVB leva a duas principais reações fotoquímicas no DNA, incluindo a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) e 6,4-fotoprodutos pirimidina-pirimidona [(6-4) PPs] (LEE et al., 2013).

A radiação UV é o agente mutagênico responsável pela maior frequência de doenças cutâneas induzidas por fatores ambientais, incluindo eritema e inflamação, alterações degenerativas de envelhecimento e câncer (AMARO-ORTIZ; YAN; D’ORAZIO, 2014). Por outro lado, os efeitos benéficos da radiação UV estão longe de serem completamente esclarecidos, no entanto, a fototerapia é uma modalidade de tratamento de segunda linha seguro e eficaz para as dermatoses mais comuns. A maioria dos esquemas de fototerapia utilizam radiação ultravioleta (RUV) de diferentes comprimentos de onda no tratamento de várias dermatoses como UVB de banda larga (290-320 nm), UVB de banda estreita (311-313 nm), UVA 1 (340-400 nm), UVA com psoraleno (PUVA), e fotoquimioterapia extracorpórea (fotoforese). As principais dermatoses que utilizam a fototerapia como forma de tratamento são

a psoríase, a parapsoríase, a dermatite atópica, os linfomas cutâneos de células T e o vitiligo vulgar (**Figura 28**) (SITUM et al., 2014).

Figura 27 – Desfechos da Luz UV na pele.

A radiação UV na luz solar ambiente é composta principalmente de energia UVA e UVB. Embora seja altamente bioativa, a radiação UVC é absorvida pela camada de ozônio, por conseguinte, os organismos terrestres não estão expostos a níveis significativos de UVC. UVB pode causar danos diretos ao DNA e atinge a epiderme. UVA pode penetrar a derme e aumenta os níveis de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) que indiretamente induzem mutação no DNA.

Fonte: Adaptado de Amaro-Ortiz et al., 2014.

Como observa-se na **figura 28**, a epiderme é a nossa primeira linha de defesa contra danos ambientais, incluindo a radiação UVB que é altamente mutagênica. As células epidérmicas possuem um conjunto de respostas aos danos UV que são altamente reguladas e que, inicialmente, servem para proteger contra o efeito carcinogênico da UVB, eliminando células danificadas por apoptose, mas ao mesmo tempo, mantêm e reparam as células danificadas para manter a função barreira da pele (PRADHAN et al., 2008).

Figura 28 – Resumo dos efeitos da radiação UV na pele.

Em verde, estão destacados alguns efeitos benéficos da RUV e em rosa, os malefícios.

Fonte: Adaptado de <http://www.healthyfellow.com/220/skin-aging-and-ellagic-acid/>

Em relação ao estudo dos efeitos imunossupressores da RUV a maioria dos estudos foram realizados em modelos animais, e estudos com exposição em seres humanos disponíveis referem-se à inibição de reações de hipersensibilidade de contato (CHS, do inglês, Contact hypersensitivity) ou de hipersensibilidade do tipo tardia (RANGWALA; TSAI, 2011). Somado a isso, a crescente pressão política e da opinião pública quanto ao uso de animais para testes de triagem de substâncias químicas, o desenvolvimento de modelos *in vitro*, *in chemico* ou *in silico* para previsão do potencial de sensibilização e imunossupressão de novos produtos químicos geram grande interesse resultando em um grande estímulo ao desenvolvimento de novas técnicas *in vitro* para a substituição de testes em animais para uso nos meios acadêmico e industrial.

1.1.1. Radiação Ultravioleta e Imunossupressão

Há trinta e nove anos atrás, Fisher e Kripke (1977), relataram pela primeira vez as propriedades imunomoduladoras da radiação ultravioleta (RUV). Desde então, a

fotoimunossupressão tem sido demonstrada numa grande variedade de modelos animais (GIBBS; NORVAL, 2013) incluindo o modelo de hipersensibilidade de contato (CHS), onde a resposta a alérgenos é utilizada para o estudo da imunossupressão induzida por UV em camundongos e humanos (LI et al., 2015).

A fotoimunossupressão pode ser local ou sistêmica. Dentre os efeitos imunológicos locais observados, a RUV anula a reação de CHS no local irradiado e induz a tolerância a antígenos aplicados (CAO et al., 2008). Os efeitos imunossupressores da RUV, especialmente da radiação UVB (290-320 nm), são bem conhecidos e particularmente evidentes devido aos efeitos inibitórios sobre a CHS (CAO et al., 2008; MAEDA et al., 2008a).

Tanto UVA quanto UVB são fotoimunossupressoras, entretanto, RUVA não causa tal efeito sozinha, ela precisa estar associada a UVB auxiliando no aumento dos seus efeitos imunossupressores. Somado a isso, UVA foi recentemente relatada como carcinogênica. A UVB atua suprimindo reações imunes primárias enquanto que UVA atua suprimindo a resposta imune de memória (ULLRICH, 2016).

Evidências experimentais indicam que a fotoimunossupressão é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele em ratos e, evidências clínicas sugerem que é também um fator de risco em seres humanos (VAID et al., 2011). A importância da imunossupressão no desenvolvimento do câncer de pele é bem ilustrada em transplantados, cuja imunossupressão crônica resulta em um dramático aumento da incidência de câncer de pele. Doses muito baixas de RUV causam significativa supressão da imunidade de memória em humanos (YIASSEMIDES et al., 2009).

Os efeitos imunossupressores da RUV contribuem para o desenvolvimento do câncer por comprometimento da resposta imune que normalmente impede o desenvolvimento de tumores, além de prejudicar significativamente as respostas imunes contra vários agentes infecciosos, tais como bactérias, vírus, parasitas e fungos, resultando assim na exacerbação de doenças infecciosas (HORI et al., 2008). Receptores de transplante de órgãos e pessoas imunossuprimidas cronicamente, residentes em regiões de intensa exposição solar estão em maior risco de desenvolver câncer de pele, e o aumento do risco é correlacionado fortemente com a exposição cumulativa aos raios UV (VAID et al., 2011). Nesse contexto, a prevenção da imunossupressão induzida por UV pode ser uma estratégia importante para a prevenção do câncer de pele.

O papel de fotoprotetores na prevenção da imunossupressão induzida por UV precisa ser esclarecida (MOYAL; FOURTANIER, 2008). Eles são conhecidamente protetores da pele contra a resposta inflamatória/queimaduras solares e, tendem a conferir pouca ou nenhuma

proteção contra a imunossupressão (MOYAL; FOURTANIER, 2008; YIASSEMIDES et al., 2009). Moyal e Fourtanier (2008) avaliaram três tipos de fotoprotetores, um apenas com proteção UVB (FPS 25), um com FPS 25 e fator de proteção UVA 14 e, um com FPS 25 e fator de proteção UVA 6. Para o primeiro, não houve proteção da fotoimunossupressão; o segundo reduziu significativamente a fotoimunossupressão local e impediu efeitos sistêmicos. Por outro lado, o terceiro, que possuía amplo espectro com menor proteção contra os raios UVA (SPF 25, fator de proteção UVA 6) não conseguiu impedir resposta induzidas por UV. Esse estudo demonstrou o papel do fator de proteção UVA na prevenção da imunossupressão por UV.

O FPS (Fator de Proteção Solar), que dá o nível de proteção contra as queimaduras solares, não é um indicador adequado da proteção fornecida contra a fotoimunossupressão (MOYAL; FOURTANIER, 2008). Como fotoprotetores químicos tendem a diminuir a ocorrência de dor devido à queimadura solar, as pessoas podem aumentar o tempo de exposição ao sol e consequentemente aumentam as chances de desenvolvimento do câncer de pele. Esse fator tem levado ao desenvolvimento de novos agentes fotoimunoprotetores que atuam por diversas vias, tais como a redução de ERO (Espécies reativas de Oxigênio), prevenção da síntese de mediadores inflamatórios e aumento do reparo do DNA (ABOUTALEBI; STRICKLAND, 2006).

1.1.1.1. Mecanismos envolvidos na fotoimunossupressão

Embora ainda haja muitas lacunas no conhecimento atual para explicar como a absorção de fótons UV pelos cromóforos da pele leva a imunossupressão, existem evidências da participação do envolvimento de múltiplas vias, tipos celulares e mediadores (GIBBS; NORVAL, 2013). Existe mais do que um mecanismo pelo qual a exposição UV provoca a imunossupressão, vários mediadores solúveis contribuem para esse processo incluindo IL-10, TNF- α , o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, o ácido cis-urocânico (cis-UCA) e prostaglandinas, entre outros (WANG; JAMESON; HOGQUIST, 2009).

Na verdade, as vias envolvidas são complexas e compostas por várias etapas (**Figura 29**) (HORI et al., 2015). A sequência exata dos eventos ainda não é completamente compreendida e pode variar com a dose e comprimento de onda, frequência de exposição, bem como com o antígeno específico e parâmetros imunológicos de interesse (GIBBS; NORVAL, 2013; NORVAL, 2006). Levando-se em conta que a maioria dos fótons de comprimento de onda de RUV associadas a fotoimunossupressão são absorvidos na epiderme, os cromóforos nas camadas superiores da pele provavelmente iniciam a cascata que conduz a esse efeito

(GIBBS; NORVAL, 2013). A seguir, são descritos alguns mecanismos e agentes responsáveis pela fotoimunossupressão.

X – Inibe a via de; + – Ativa a via de.

Figura 29 – Alguns mecanismos moleculares que desencadeiam a fotoimunossupressão.

A fotoimunossupressão pode estar ligada a um maior dano genético e à produção de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio). Nem todas estas conexões foram diretamente verificadas experimentalmente, e muitos detalhes ainda não são conhecidos. A radiação solar ultravioleta (RUV) provoca a formação de ERO, o que resulta na produção de fator de ativação de plaquetas (PAF). A RUV também provoca a isomerização de ácido trans-urocânico (*trans*-UCA) para *cis*-UCA. UCA está presente em grandes quantidades na epiderme. Ambos PAF e ácido *cis*-UCA ligam-se aos seus receptores inibindo o reparo de fotoprodutos de DNA induzidos por UV (Dímeros de Ciclobutano Pirimidina (CPD)), possivelmente por meio da produção de ERO, que por sua vez inibem as enzimas de reparo do DNA. ERO podem causar danos oxidativos ao DNA, tal como 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG) e também, juntamente com o óxido nítrico (NO), podem danificar as enzimas de reparo do DNA, inibindo o reparo, o que leva indiretamente a um aumento de danos ao DNA. O estrogênio provavelmente regula esses processos por meio da indução de enzimas antioxidantes. A indução de dano ao DNA é essencial para estas vias imunossupressoras com exceção da vitamina D, que aumenta o reparo de danos no DNA. Os queratinócitos reagem com a produção de citocinas pró-inflamatórias (tais como a interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF)), que por sua vez ativam as células dendríticas dérmicas (DCs), na presença ou ausência de antígenos. A RUV induz a migração de células epidérmicas de langerhans (LCs) e células dendríticas dérmicas para os linfonodos e, destrói a função de células de Langerhans por: indução de apoptose, alteração do fenótipo da superfície, ou por aumento da migração para os linfonodos. LCs alteradas podem induzir anergia ou eliminação de células Th1. Por último, os macrófagos infiltrantes da pele secretam IL-10, uma citocina anti-inflamatória.

Fonte: Adaptado de (HALLIDAY, 2010; HORI et al., 2008; MAVERAKIS et al., 2010).

IL-10 e Células T regulatórias

IL-10 é uma conhecida citocina imunossupressora e é importante para a fotoimunossupressão. A capacidade inibitória de células T regulatórias (Treg) induzidas por UV é dependente da expressão de IL-10 (Hori et al., 2015). Níveis elevados de IL-10 e indução de Treg são importantes mediadores da imunossupressão induzida por RUV (Lewis et al., 2011). Um estudo usando radiação UVB demonstrou que a inibição da hipersensibilidade de contato em fotoforese extracorpórea experimental ocorre devido a um aumento nos níveis de IL-10 e indução de Treg, o que poderia explicar o bloqueio das fases de sensibilização e efectoras (MAEDA et al., 2008b). As Treg induzidas por RUV têm papéis importantes na fotoimunossupressão e carcinogênese da pele e são capazes de transferir a supressão imunitária específica antigênica para animais normais não tratados com RUV (LI et al., 2015).

Rivas e Ullrich (1992) verificaram que a radiação UVB causa aumento dose-dependente da transcrição e secreção de IL-10 em culturas de queratinócitos humanos 24 h após a irradiação *in vitro*, sugerindo que a IL-10 derivada de queratinócitos pode ser um componente importante da imunossupressão resultante da irradiação com UVB (RIVAS; ULLRICH, 1992). Entretanto, a fonte de IL-10 na pele de murino e na pele humana parece diferir: a RUV induz a produção de IL-10 epidérmica por queratinócitos em murinos e, nos humanos, ela é predominantemente derivada de melanócitos e macrófagos (KANG et al., 1998).

Outro elemento-chave que pode ser induzido após exposição aos raios UV e está implicado na fotoimunossupressão é o TNF- α que pode ser induzido em queratinócitos e mastócitos dérmicos após irradiação UV e é capaz de induzir a liberação de IL-10 em monócitos humanos *in vitro* (YOSHIDA et al., 1998).

Danos ao DNA

Danos diretos no DNA possuem uma correlação com a supressão imune por UV (PRADHAN et al., 2008). Danos no DNA induzidos por RUV em células apresentadoras de antígenos parecem desempenhar um papel chave na supressão de reações imunitárias na pele. Células de Langerhans que tenham sofrido danos ao DNA induzidos por UV são as principais efectoras da fotoimunossupressão (VAID et al., 2013).

Células dendríticas

Quando LCs são isoladas e cultivadas *in vitro* e irradiadas com UVB, elas apresentam-se alteradas tanto fenotípica quanto funcionalmente e, em processo de apoptose. Algumas LCs, no entanto, mostram maturação quando irradiadas com UVB *in vivo* ou *ex vivo* (CAO et al.,

2008). Entretanto, um estudo de Wang et al. (2009) demonstrou que a presença de LCs não são necessárias para a imunossupressão por UV pois, embora LCs produzam alguns mediadores imunossupressores solúveis, outros tipos celulares como os queratinócitos, também os produzem. Além disso, a indução de células T regulatórias que acredita-se ter um papel importante na indução da supressão por UV pode ocorrer independentemente de LCs (WANG; JAMESON; HOGQUIST, 2009). Os mecanismos pelos quais a radiação UVB ativa as células dendríticas (DCs) ainda não foram bem descritos (CAO et al., 2008). Estudos em modelos de ratos com depleção de LCs mostram que as LCs podem ou não ser necessárias. Curiosamente, os monócitos sanguíneos que expressam moléculas de Gr-1 e CD11b são capazes de infiltrar, proliferar e diferenciar-se em LC em pele tratada com RUV (LI et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos imunossupressores da radiação solar que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV) em um modelo de epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI), utilizando como parâmetro para validação do método a anulação dos efeitos de agentes sensibilizantes conhecidos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a citotoxicidade dos compostos sobre o RHEI (RHE e células THP-1) após exposição ou não a radiação solar que mimetiza o sol do meiodia (ssUV);
- Padronizar a exposição do equivalente epidérmico à radiação solar em simulador solar;
- Avaliar a funcionalidade do modelo após a exposição à ssUV com ou sem sensibilização posterior.
- Avaliar a liberação de IL-10 como *endpoint* no modelo de RHE imunocompetente (RHEI);

3. METODOLOGIA

3.1. Radiações e equipamento utilizados

As RHEs (RHE e RHEIs) são expostos a radiação UVA (400-320nm), UVB (320-280 nm) e ao espectro de radiação solar que mimetiza o sol do meio-dia (compreendendo as radiações IV+Visível+UVA+UVB; ~700-300nm) emitidas por simulador solar (Sciencetech Inc., London, Ontário, Canadá) empregando-se uma lâmpada OSRAM (Xenon Arc XBO 2500 W/HS OFR, Berlin, Alemanha). Os filtros empregados para a obtenção da radiação UVA foram filtros UV Hot, UV pass e UVB cut; para a radiação UVB foram empregados os filtros UV Hot, UV pass e UVB; e, para o espectro de radiação solar que mimetiza o sol do meio dia empregou-se o filtro AM 1.5 G (Espectros de radiação – **ANEXO**).

3.2. Avaliação da viabilidade da epiderme humana reconstruída (RHE) após exposição à radiação que mimetiza o sol do meio-dia, radiação UVB e radiação UVA

Uma curva dose-resposta de citotoxicidade da radiação solar foi determinada para as RHEs utilizando-se diferentes doses de UVA (0; 6,25; 12,5 e 25 J/cm²), UVB (0; 30; 60 e 90 mJ/cm²) e radiação solar que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV) (0; 2,5; 5 e 10 J/cm²) por meio do ensaio de MTT.

3.3. Exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a substâncias sabidamente alergênicas e RUV

Para verificar se a RHEI fornece parâmetros para avaliação de imunossupressão induzida por RUV, as RHEIs foram irradiadas com ssUV e expostas a agentes sensibilizantes. Para isso, 24 h após a irradiação das RHEIs, substâncias alergênicas (brometo de 4-nitrobenzila) e não-

alergênicas (DMSO) (30 µL de solução de cada substância) foram aplicadas topicamente sobre o equivalente de epiderme imunocompetente. O RHEI ficará exposto às substâncias por 24 h. Após esse período, o RHEI foi lavado e dividido para as análises, sendo o RHE para análises imunohistoquímicas (para dano no DNA do tipo 8-Oxo-deoxigaunosina (8-Oxo-dG) e CPD) e de viabilidade por MTT, as células THP-1, analisadas por citometria de fluxo para expressão de CD86 e CD54, e, o meio de cultura abaixo do *transwell* para análise de citocinas por ELISA.

A **figura 30** traz um resumo esquemático dos ensaios que foram realizados para avaliação do efeito imunossupressor da radiação solar.

Figura 30 – Representação esquemática dos ensaios para avaliação do efeito imunossupressor da radiação solar em equivalente de epiderme imunocompetente.

3.4. Análise Estatística

Os resultados de todos os ensaios foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente, usando o software GraphPad Prism 5 (One-way analysis of variance - ANOVA), com um valor de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da viabilidade do RHE após exposição à radiação UV (RUV)

A citotoxicidade de diferentes doses de radiação UV (RUV) foi avaliada como primeiro parâmetro para escolha das doses de estudo dos efeitos imunossupressores da RUV em equivalente de epiderme imunocompetente (RHEI). Para a avaliação, equivalentes de epiderme foram expostos ao espectro de radiação solar que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV), a radiação UVA e a radiação UVB em diferentes doses de radiação. As doses de radiação escolhidas para estudo da citotoxicidade da ssUV foram 0; 2,5; 5 e 10 J/cm². Nenhuma das doses utilizadas causou efeitos visíveis histologicamente e apenas a dose de 10 J/cm² promoveu uma redução na viabilidade de menos de 10 %, sem significado biológico (**Figura 31**).

Figura 31 – Efeitos do espectro de radiação solar que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV) em epiderme humana reconstruída (RHE).

Fotomicrografias dos cortes histológicos (5 µm) corados por Hematoxilina-Eosina (HE): A) Controle Negativo; B) ssUV 2,5 J/cm²; C) ssUV 5 J/cm²; e, D) ssUV 10 J/cm². Aumento: 20x (barra = 200 µm). O gráfico representa a viabilidade das RHEs após exposição a diferentes doses de ssUV (0; 2,5; 5 e 10 J/cm²). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão de experimentos independentes (n=3). (***)p < 0,001.

Para avaliação dos efeitos da radiação UVB foram avaliadas as doses de 0; 30; 60 e 90 mJ/cm². As doses de radiação UVB estudadas não causaram efeitos histologicamente visíveis e, apenas as doses mais altas (60 e 90 mJ/cm²) causaram redução da viabilidade celular (**Figura 32**). Vale ressaltar que danos ao DNA na epiderme exposta a UVB são extensamente

conhecidos, portanto, análises de danos ao DNA devem ser realizadas para definição da dose ideal de estudo.

Figura 32 – Efeitos da radiação UVB em epiderme humana reconstruída (RHE). Fotomicrografias dos cortes histológicos (5 μ m) corados por Hematoxilina-Eosina (HE): A) Controle Negativo; B) UVB 30 mJ/cm²; C) UVB 60 mJ/cm²; e, D) UVB 90 mJ/cm². Aumento: 20x (bar= 200 μ m). O gráfico representa a viabilidade das RHEs após exposição a diferentes doses de UVB (0; 30; 60 e 90 mJ/cm²). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). (**) $p < 0,01$; e, (***) $p < 0,001$.

O espectro de radiação UVA foi analisado nas doses de 0; 6,25; 12,5 e 25 J/cm². Diferentemente das doses estudadas para ssUV e UVB, as doses escolhidas para UVA causaram modificações visíveis na histologia dos equivalentes de epiderme e, na maior dosagem estudada (25 J/cm²) obtivemos redução da viabilidade em cerca de 30 % (**Figura 33**).

Figura 33 – Efeitos da radiação UVA em epiderme humana reconstruída (RHE). Fotomicrografias dos cortes histológicos: A) Controle Negativo; B) UVA 6,25 J/cm²; C) UVA 12,5 mJ/cm²; e, D) UVA 25 J/cm². Aumento: 20x (bar= 200 μ m). O gráfico representa a viabilidade das RHEs após exposição a diferentes doses de UVA (0; 6,25; 12,5 e 25 J/cm²). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). (***) $p < 0,001$. Aumento: 20x (bar= 200 μ m).

Observa-se que em todas as doses de UVA estudadas, houve alteração da camada granulosa e discreta vacuolização. Na dosagem de 25 J/cm² ainda podemos observar a presença de núcleos picnóticos.

4.2. Viabilidade celular da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) após exposição a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV)

A viabilidade do RHEI após exposição a radiação que mimetiza o sol do meio-dia foi avaliada por ensaio de MTT na epiderme humana reconstruída e por citometria de fluxo nas células THP-1. Na **figura 34** observa-se que a viabilidade do RHE não é significativamente afetada após a exposição a ssUV com exposição subsequente ou não ao composto alérgeno (brometo de 4-nitrobenzila (NBZ)). Entretanto, linhagem celular THP-1 no RHEI apresenta uma pequena redução da viabilidade após a exposição a ssUV (**figura 34**). Vale ressaltar, entretanto, que a viabilidade obtida encontra-se dentro dos parâmetros exigidos para adequada resposta da THP-1. Um dos critérios estabelecidos pelo h-Clat (*Human Cell Line Activation Test*) é que a viabilidade celular da linhagem THP-1 seja maior ou igual a 75 % (SAKAGUCHI et al., 2009), esse critério foi respeitado durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Figura 34 – Viabilidade da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) 24h após exposição a 5 J/cm² de radiação que mimetiza o sol do meio dia (ssUV).

A. Viabilidade da epiderme humana reconstruída (RHE). B. Viabilidade da linhagem celular THP-1. Cada barra representa média $\pm$ desvio padrão (n=3). CN – Controle negativo (RHEI não irradiado), NBZ – brometo de 4-nitrobenzila a 3,7 μ g/mL (agente sensibilizante), ssUV (RHEI exposto a radiação que mimetiza o sol do meio dia).

4.3. Avaliação da anulação da hipersensibilidade de contato após exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV)

Para avaliação dos efeitos imunossupressores da ssUV, optamos pela análise dos marcadores de membrana expressos em células THP-1 (CD86/CD54) após exposição a substâncias com potencial alergênico. Tais efeitos foram avaliados em diferentes períodos (24h e 72h), buscando-se mimetizar o que observa-se *in vivo*. Na tabela 1, apresentamos os resultados da expressão dos marcadores CD86 e CD54 em células THP-1 presentes no RHEI irradiado ou não com ssUV. Os resultados demonstram que não houve imunossupressão do RHEI, pois o agente sensibilizante, permanece sensibilizando a epiderme, assim como no controle (**Tabela 12**).

Tabela 12 – Avaliação da expressão dos marcadores CD86 e CD54 após 24h ou 72h da exposição ou não da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a 5 J/cm² de radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV) e exposto ou não a agentes sensibilizantes

	CD86	CD54	Classif.	CD86	CD54	Classif.
CN	-	-	NS	-	-	NS
NBZ	+	+	S	+	+	S
ssUV 5 J/cm ²	-	-	NS	-	-	NS
ssUV 5 J/cm ² + NBZ	+	+	S	+	+	S

(+) positivo para CD86 quando RFI obtido foi ≥ 150 e para CD54 quando ≥ 200 .

Os resultados representam experimentos independentes (n=3).

CN (controle negativo), NBZ (brometo de 4-nitrobenzila) a 3,7 µg/mL, Classif. (Classificação), S (Sensibilizante), NS (Não-sensibilizante).

4.4. Avaliação da liberação da interleucina imunossupressora IL-10 e dano oxidativos ao DNA do tipo 8-Oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) após exposição da epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV)

Durante os ensaios de avaliação dos efeitos imunossupressores da RUV, coletou-se o sobrenadante de RHEs e de RHEIs exposto ou não a ssUV. Assim, buscamos avaliar a liberação de IL-10, uma interleucina imunossupressora que é uma das principais responsável pela fotoimunossupressão, nos períodos de 24 h e 72 h. A liberação de IL-10 no RHE apresentou-se como abaixo do limite de detecção em ambos períodos avaliados, o que já era esperado pois a produção dessa interleucina pelos queratinócitos é muito baixa. Entretanto, também não foi possível a detecção de IL-10 no sobrenadante oriundo do RHEI nos períodos de 24h e 72h após a exposição, o que em parte, justifica os resultados obtidos acima, pois apenas o dano oxidativo do tipo 8-oxo-dG no DNA (**Figura 35**) não é suficiente para que ocorra a fotoimunossupressão.

Figura 35 – Avaliação de danos oxidativos do tipo 8-Oxo-dG (8-Oxo-2'-deoxiguanosina) no DNA. Avaliação imunohistoquímica do RHE 24 h após exposição a radiação que mimetiza o sol do meio-dia (ssUV). A – Controle negativo, B – ssUV 2,5 J/cm², C – ssUV 5 J/cm², e, D - ssUV 10 J/cm².

5. DISCUSSÃO

Neste capítulo avaliamos o potencial do modelo de epiderme humana reconstruída imunocompetente (RHEI) para uso em avaliação de efeitos imunossupressores da radiação UV. Assim, focamos na avaliação de dois *endpoints*: 1) a liberação de IL-10, uma conhecida citocina supressora da proliferação de células T e produção de citocinas, que é essencial para a tolerância periférica a alérgenos, auto-antígenos, antígenos transplantados e antígenos tumorais (TAYLOR et al., 2006); e, 2) a anulação da hipersensibilidade de contato (CHS, do inglês, Contact hypersensitivity), por ser o principal efeito imunossupressor local observado após exposição a radiação UV (RUV) (CAO et al., 2008). Para tanto, utilizamos o modelo de RHEI descrito no capítulo 3 como um modelo promissor para avaliação de sensibilização cutânea *in vitro*.

A epiderme é a nossa principal proteção contra agressões ambientais tais como a radiação ultra-violeta (RUV), considerada um potente cancerígeno (HILDESHEIM; AWWAD; FORNACE, 2004). Somado a isso, a RUV possui um papel imunossupressor, e, estudos usando ratos, demonstraram uma forte ligação entre os efeitos fotoimunossupressores e o desenvolvimento de câncer (RIVAS; ULLRICH, 1992). Contudo, não está claro como a RUV induz a fotoimunossupressão (CHEN et al., 2016; RIVAS; ULLRICH, 1992) e a literatura sugere que esses efeitos ocorrem devido ao envolvimento de fatores solúveis induzidos após a exposição a RUV (RIVAS; ULLRICH, 1992).

Os queratinócitos são o alvo principal da RUV e, após expostos, desempenham um papel central nas alterações inflamatórias e imunomodulatórias, pelo menos em parte, por meio da liberação de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α), 22 produtos de COX (KABASHIMA et al., 2007), ativação genética de morte celular programada e, eventual substituição de células condenadas por meio de hiperproliferação (HILDESHEIM; AWWAD; FORNACE, 2004).

Em modelos animais uma única dose de RUV é capaz de causar imunossupressão e anulação da CHS (KIM; KRIPKE; ULLRICH, 1990). No entanto, a falta de métodos adequados para avaliação da imunossupressão permanece um desafio para estudos fotodermatológicos (CHEN et al., 2016).

A liberação de IL-10 por queratinócitos expostos a RUV pode explicar a supressão seletiva, ou seja, a inibição de reações imunes mediadas por células, mas não a produção de

anticorpos, evento observado após a exposição a RUV ou injeção de sobrenadantes de queratinócitos irradiados (RIVAS; ULLRICH, 1992). Nós avaliamos a liberação de IL-10 por queratinócitos no RHE e no RHEI expostos a radiação que mimetiza o sol do meio dia (ssUV) em diferentes períodos, no entanto, não obtivemos liberação detectável de IL-10 no RHE, o que explica-se devido ao fato de essa interleucina não ser produzida majoritariamente por melanócitos e e macrófagos (KANG et al., 1998). Entretanto, o RHEI exposto a ssUV também não respondeu como esperado; o sobrenadante contendo os fatores solúveis secretados pelas células THP-1 (monócitos) em conjunto com os queratinócitos presentes no RHE, nos períodos analisados, não apresentava IL-10 em níveis detectáveis.

O dano ao DNA induzido por UV é responsável pela liberação de citocinas e indução de imunossupressão (ULLRICH, 2016) sendo um dos principais mediadores moleculares de fotoimunossupressão (CHEN et al., 2016). Neste trabalho, não observamos danos ao DNA do tipo dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) por análise imunohistoquímica, o que pode ter ocorrido devido a mecanismos de reparo do DNA. A formação de (CPD), desempenha um papel essencial na indução de imunossupressão (SREEVIDYA et al., 2010). Em contrapartida, em todas as doses analisadas foi possível observar o dano no DNA do tipo 8-Oxo- dG, entretanto, o dano observado não teve correlação com a anulação da CHS nem com a liberação de IL-10.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem causar dano oxidativo direto no DNA, o que é evidenciado pelo acúmulo de 8-Oxo-dG, ou podem inibir proteínas envolvidas no processo de reparo do DNA, permitindo o acúmulo de formas que não estão diretamente relacionados com ERO, tais como CPD. Observa-se então que há a convergência de vários mecanismos que aumentam o dano ao DNA e que em conjunto levam a imunossupressão (SREEVIDYA et al., 2010).

Embora os primeiros conhecimentos sobre fotoimunologia tenham sido originados a partir de estudos sobre o efeito da radiação UV sobre a resposta imune contra tumores fotoinduzidos, a maioria dos estudos subsequentes utilizaram o modelo de CHS (SCHWARZ, 2008). Assim como ocorre nos modelos animais, utilizamos o agente dinitrofluorobenzeno, composto químico reativos de baixo peso molecular e que a medida que se liga com as proteínas da pele, para formar o antígeno, são chamados de haptenos (SCHWARZ et al., 2004; SCHWARZ, 2008). Nós avaliamos a capacidade da ssUV de anular a hipersensibilidade de contato no RHEI em diferentes períodos, entretanto, a sensibilização cutânea *in vitro* foi observada. Fato que acreditamos ter ocorrido devido a ausência de IL-10 no sobrenadante do RHEI pois a IL-10 é capaz de inibir tanto a fase de indução quanto a fase de elicitação da CHS (SCHWARZ et al., 2004).

A pele humana está constantemente exposta a possíveis alérgenos e, além disso, é um órgão que é propenso a auto-imunidade. Assim, parece ser benéfico especular que um certo grau de imunossupressão constante pela exposição solar diária pode prevenir a indução dessas respostas imunitárias, ainda assim, essas reações ainda precisam ser esclarecidas. Somado a isso, mesmo que essa imunossupressão seja benéfica, faz-se necessário não esquecer que a exposição solar excessiva e crônica continuará a ser uma das maiores ameaças ambientais para a saúde humana (SCHWARZ, 2008).

6. CONCLUSÃO

Os valores de citotoxicidade obtidos para linhagem THP-1 no equivalente de epiderme imunocompetente e a expressão dos marcadores CD86/CD54 indicam que a linhagem celular continua funcional após a irradiação do RHEI, não demonstrando efeito imunossupressor local. Somado a isso, a exposição a radiação que mimetiza o sol do meio-dia não foi suficiente para a liberação da interleucina imunossupressora IL-10 pelo RHE ou pelo RHEI. Assim, os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que o modelo apresenta-se promissor para avaliação de ativação do sistema imune (SI), entretanto, para avaliação de supressão do SI induzida por radiação ultravioleta, a metodologia escolhida não é a ideal para observação de tais efeitos neste modelo.

REFERÊNCIAS

ABOUTALEBI, S.; STRICKLAND, F. M. Immune protection, natural products, and skin cancer: is there anything new under the sun? **Journal of drugs in dermatology**, v. 5, n. 6, p. 512–7, 2006.

AMARO-ORTIZ, A.; YAN, B.; D’ORAZIO, J. A. Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation. **Molecules**, 2014.

CAO, C. et al. EGFR activation confers protections against UV-induced apoptosis in cultured mouse skin dendritic cells. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 10, p. 1830–1838, 2008.

CHEN, Q. et al. Prevention of ultraviolet radiation-induced immunosuppression by sunscreen in *Candida albicans*-induced delayed-type hypersensitivity. **Molecular medicine reports**, v. 14, n. 1, p. 202–208, jul. 2016.

GIBBS, N. K.; NORVAL, M. Photoimmunosuppression: a brief overview. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 29, n. 2, p. 57–64, abr. 2013.

HALLIDAY, G. M. Common links among the pathways leading to UV-induced immunosuppression. **The Journal of investigative dermatology**, v. 130, n. 5, p. 1209–1212, 2010.

HILDESHEIM, J.; AWWAD, R. T.; FORNACE, A. J. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 2, p. 497–502, 2004.

HORI, T. et al. Alloantigen-specific prolongation of allograft survival in recipient mice treated by alloantigen immunization following ultraviolet-B irradiation. **Transplant Immunology**, v. 19, n. 1, p. 45–54, 2008.

HORI, T. et al. Ultraviolet-induced alloantigen-specific immunosuppression in transplant immunity. **World journal of transplantation**, v. 5, n. 1, p. 11–8, 2015.

KABASHIMA, K. et al. Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. **Laboratory investigation**, v. 87, n. 1, p. 49–55, 2007.

KANG, K. et al. In human skin, UVB initiates early induction of IL-10 over IL-12 preferentially in the expanding dermal monocytic/macrophagic population. **The Journal of investigative dermatology**, v. 111, n. 1, p. 31–38, jul. 1998.

KIM, T. Y.; KRIPKE, M. L.; ULLRICH, S. E. Immunosuppression by factors released from UV-irradiated epidermal cells: selective effects on the generation of contact and delayed hypersensitivity after exposure to UVA or UVB radiation. **The Journal of investigative dermatology**, v. 94, n. 1, p. 26–32, jan. 1990.

LEE, C. H. et al. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implication in UV-based phototherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6414–6435, 2013.

LI, H. et al. Interleukin-17 mediated inflammatory responses are required for ultraviolet radiation-induced immune suppression. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 1, p. 235–241, 2015.

MAEDA, A. et al. Experimental extrocorporeal photopheresis inhibits the sensitization and effector phases of contact hypersensitivity via two mechanisms: generation of IL-10 and induction of regulatory T cells. **Journal of immunology**, v. 181, n. 9, p. 5956–62, 2008a.

MAEDA, A. et al. Phenotypic and functional characterization of ultraviolet radiation-induced regulatory T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 180, n. 5, p. 3065–3071, 2008b.

MAVERAKIS, E. et al. Light, including ultraviolet. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 3, 2010.

MOYAL, D. D.; FOURTANIER, A. M. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet-simulated radiation and natural sunlight-induced immunosuppression in human beings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5 SUPPL. 2, 2008.

NORVAL, M. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, n. 1, p. 108–118, set. 2006.

PRADHAN, S. et al. A Critical Role for the Proapoptotic Protein Bid in Ultraviolet-Induced Immune Suppression and Cutaneous Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 5, p. 3077–3088, 1 set. 2008.

RANGWALA, S.; TSAI, K. Y. Roles of the immune system in skin cancer. **British Journal of Dermatology**, 2011.

RIVAS, J. M.; ULLRICH, S. E. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. **Journal of immunology**, v. 149, n. 12, p. 3865–71, 1992.

SAKAGUCHI, H. et al. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test–human cell line activation test (h-CLAT). **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 2, p. 109–126, abr. 2009.

SCHWARZ, A. et al. Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. **Journal of immunology**, v. 172, n. 2, p. 1036–43, 2004.

SCHWARZ, T. 25 Years of UV-induced immunosuppression mediated by T Cells - From disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 1, p. 10–18, 2008.

SITUM, M. et al. Benefits of controlled ultraviolet radiation in the treatment of dermatological diseases. **Collegium antropologicum**, v. 38, n. 4, p. 1249–1253, 2014.

SREEVIDYA, C. S. et al. Agents that reverse UV-Induced immune suppression and photocarcinogenesis affect DNA repair. **The Journal of investigative dermatology**, v. 130, n. 5, p. 1428–1437, 2010.

TAYLOR, A. et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 433–442, abr. 2006.

ULLRICH, S. E. **Mechanisms by Which UV Radiation, a Natural Component of Sunlight, Suppresses the Immune Response**. In: ESSER, C. (Ed.). . Environmental Influences on the Immune System. Vienna: Springer Vienna, 2016. p. 155–179.

VAID, M. et al. Proanthocyanidins inhibit UV-induced immunosuppression through IL-12-dependent stimulation of CD8 + effector T cells and inactivation of CD4 + T cells. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 2, p. 238–247, 2011.

VAID, M. et al. Silymarin inhibits ultraviolet radiation-induced immune suppression through DNA repair-dependent activation of dendritic cells and stimulation of effector T cells. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n. 8, p. 1066–1076, abr. 2013.

WANG, L.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Epidermal Langerhans cells are not required for UV-induced immunosuppression. **Journal of immunology**, v. 183, n. 9, p. 5548–5553, 2009.

YIASSEMIDES, E. et al. Oral nicotinamide protects against ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 1, p. 101–105, 2009.

YOSHIDA, Y. et al. Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin. **Journal of immunology**, v. 161, n. 11, p. 5873–9, 1998.

São Paulo, 15 de julho de 2013.

Ilustre Senhor,

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos" - **Pesquisador(a) Responsável:** Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler – **Equipe de Pesquisa:** Camila Eduardo Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos, Paula Comune Pennacchi, Paula Anastácia Ferreira, Fernanda Branco Filippin, Guilherme Galvão dos Santos, Renato Ramos Massaro, Bianca Ferruccio - **CEP-HU/USP:** 943/09 – **Registro CAAE:** 0062.0.198.000-09

Prezada Professora

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 05 de julho de 2013, APROVOU o Adendo encaminhado por V.Sa., referente à **inclusão das alunas de pós-graduação: Silvana Sandri, Tatiana do Nascimento Pedrosa, Carolina Motter Catarino, Andréa Costa Fruct e Fernanda Faião Flores**, na equipe de pesquisa.

Aproveitamos também para informar a APROVAÇÃO do Relatório Parcial do referido estudo (período: fevereiro de 2011 a junho de 2013), datado de 27 de junho de 2013.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comitê de Ética em Pesquisa – CEPOfício CEP/FCF **20.2015**

São Paulo, 21 de maio de 2015.

Senhora Professora,

Com relação à solicitação de 5 de maio de 2015, relativamente à inclusão de membros no grupo do projeto de pesquisa **Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos** (CEP 517), este CEP manifesta-se favorável à inclusão de novos membros na equipe, conforme documentação apresentada.

Cordialmente,

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Coordenador do CEP/FCF/USP

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler
FBC/FCF/USP

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

São Paulo, 05 de maio de 2015.

Caro coordenador do CEP/FCF – USP

Venho por meio desta, solicitar atualização referente aos membros participantes do projeto intitulado "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos", sob número de registro P/CEP/FCF/534, sob responsabilidade da pesquisadora Prof. Dr. Silvy Stuchi Maria-Engler.

Informo que os membros participantes do projeto são:

Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria-Engler	Pesquisadora Responsável	Regular
Dr. José Otsch	Médico Responsável	Regular
Dr(a). Linda Maximiano	Médica Responsável	Regular
Prof. Dr. Amílcar Glon	Médico Responsável	Regular
Paula Comune Pennacchi	Aluna de pós-graduação	Regular
Fernanda Fialho-Flores	Pós-doutoranda	Incluir
Érica de Oliveira	Pós-doutoranda	Incluir
Thalita Boldrin Zanoni	Pós-doutoranda	Incluir
Tatiana Nascimento Pedrosa	Aluna de pós-graduação	Incluir
Débora Kristina Alves	Aluna de pós-graduação	Incluir
Manoela Tiago dos Santos	Aluna de pós-graduação	Incluir
Nayane de Souza	Aluna de pós-graduação	Incluir

Além disso, deverão ser retirados do registro os ex-alunos: Fernanda Filippin, Guilherme dos Santos e Paula Anastácia Ferreira, por não estarem mais envolvidos com as atividades relacionadas a este projeto.

Desde já agradeço por sua disponibilidade,

Prof. Dr. Silvy Stuchi Maria-Engler
Associate Professor
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes 580, B.17
São Paulo, SP 05508-900, Brasil
Telephone: +55 11 3091 3631/Fax: +55 11 3813 2197
silvy@usp.br

Substância	Cas No.	PM	d	Estado físico	IC50	CV75	Veículo	CD86	CD54	Classificação	Referência
Fenol	108-95-2	94,11	1,07 g/cm ³	Sólido		308,8 µg/mL ² 391,4 µg/mL ²	Água ⁴	+ ³	+ ³	NS/Corrosivo	¹ Ashikaga et al., 2010 ² Kosaka et al., 2010 ³ Mizuno et al., 2013 ⁴ Johansson et al., 2011
DMSO	67-68-5	78,12	1,1 g/cm ³	Líquido	2,5 mg/mL ^{3,4} > 5 mg/mL ⁵	> 5 mg/mL ^{1,2}	RPMI ⁵	- ^{1,3}	- ^{1,3}	NS ²	¹ Hirota et al., 2013 ² Tsujita-Inoue et al., 2014 ³ Sakaguchi et al., 2006 ⁴ An et al., 2009 ⁵ Suzuki et al., 2009
Isopropanol	67-63-0	60,1	0,795 g/cm ³	Líquido	16 mg/mL ³ > 5 mg/mL ⁴	> 5 mg/mL ¹	Salina ¹ RPMI ² Água ⁵	- ¹	- ¹	NS ¹	¹ Ashikaga et al., 2010 ² Arkusz et al., 2010 ³ An et al., 2009 ⁴ Suzuki et al., 2009 ⁵ Johansson et al., 2011
Ácido láctico	50-21-5	90,07	-		> 5 mg/mL ² 2,4 mg/mL ^{3,4}	2,8 mg/mL ¹	Salina ¹ Água ⁵	- ^{1,2}	- ^{1,2}	NS ⁴	¹ Ashikaga et al., 2010 ² Sakaguchi et al., 2009 ³ An et al., 2009 ⁴ Cao et al., 2013 ⁵ Johansson et al., 2011
Ácido Octanóico	124-07-2	405,117	-		> 1 mg/mL ² 2400 ± 31,8 µg/mL ⁴	359 µg/mL ¹ > 1 mg/mL ³	DMSO ¹	- ¹	+ ¹	NS ¹	¹ Ashikaga et al., 2010 ² Suzuki et al., 2009 ³ Martinez et al., 2013 ⁴ Cao et al., 2013

d – Densidade; PM – Peso molecular.

Espectros Simulador Solar

PRODUÇÃO REFERENTE A ESTE PROJETO

RESUMOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

2014

1. **PEDROSA, T. N.; CATARINO, C. M.; PENNACCHI, P. C.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Reconstruction of Human Epidermis Equivalent as Platform for Skin Irritation Risk Assessment.** In: II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2014, Búzios. Abstracts Book - II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2014. p. 2-2. (**Apresentação oral**)
2. MARIA-ENGLER, S. S.; IMICHH, (...) **PEDROSA, T. N.; ROMANO, S.; SANDRI, S.; ZANONI, T. B.; BARROS, S. B. M. Artificial Skin in Perspective of Alternative Methods to Animal Experimentation in Brazil.** In: FutureTox II: In Vitro Data and In Silico Models for Predictive Toxicology, 2014, Chapel Hill, North Carolin. FutureTox II: In Vitro Data and In Silico Models for Predictive Toxicology, 2014.
3. CATARINO, C.; PENNACHI, P.; **PEDROSA, T. N.; BARROS, S.; MARIA-ENGLER, S. In vitro skin corrosion as a pre-validation study of Reconstructed Human Epidermis in house developed.** In: 9th World Congress on Alternative and Animal Use in the Life Sciences, 2014, Prague. Abstracts of the 9th World Congress, Prague, 2014, 2014. v. 3. p. 299-300. (**Apresentação oral**)

2015

1. ZANONI, T. B. ; **PEDROSA, T. N. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Epidermal equivalent assay: A useful tool to predict toxicity and sensitization potential of ingredients used in permanent hair dyes.** In: 51st Congress of the European Societies of Toxicology, 2015, Porto - Portugal. Toxicology Letters Special Issues - Abstracts of the 51st Congress of the European Societies of Toxicology, 2015. v. 238. p. S189.

2. **PEDROSA, Tatiana do Nascimento; CATARINO, C. M. ; PENNACHI, P. C. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. . A Novel Reconstructed Human Epidermis Model for Skin Irritation Tests.** In: XX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of The Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo and 7th Annual Research Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2015, São Paulo - SP. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. v. 51.
3. ZANONI, T. B. ; PEDROSA, T. N. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . **Mixture of ingredients used in permanent hair dye leads to morphological change, increases cell death and DNA fragmentation in in vitro epidermal reconstructs.** In: 9th CTDC and XIX CBTox, 2015, Natal-RN-Brasil. Applied Research in Toxicology, 2015. v. 1. p. 39.
4. **PEDROSA, T. N.; ALBUQUERQUE, R. C. ; CATARINO, C. ; PENNACHI, P. C. ; FRUET, A. C. ; GIMENES, F. ; ASSIS, S. R. ; CONSOLARO, M. E. L. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Development of an in vitro epidermal model to evaluate skin sensitization.** In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (9° CTDC) e XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2015, Natal - RN. Applied Research in Toxicology, 2015. v. 1. p. 33. (**Apresentação oral**)

2016

1. **PEDROSA, Tatiana do Nascimento; ALBUQUERQUE, R. C. ; CATARINO, C. M. ; PENNACHI, P. C. ; GIMENES, F. ; CONSOLARO, M. E. L. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Recreating an Immune Responsive Skin in Vitro: Cross-Talking Between Reconstructed Human Epidermis (RHE) and Immune THP-1 Cells.** In: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia e 8° Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, 2016, São Paulo - SP. (**Apresentação oral / Prêmio: 1º lugar categoria doutorado**)
2. **PEDROSA, Tatiana do Nascimento; De VUYST, E. ; MOUND, A. ; ROUVROIT, C. L. ; MARIA-ENGLER, S. S. ; POUMAY, Y. . Role of Th2-Related Cytokines and Cholesterol Depletion in an In Vitro Model of Atopic Dermatitis.** In: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia e 8° Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, 2016, São Paulo - SP.

Artigos submetidos

1. **Tatiana do Nascimento Pedrosa**, Carolina Motter Catarino¹, Paula Comune Pennacchi¹, Sílvia Romano de Assis¹, Fabrícia Gimenes², Márcia Edilaine Lopes Consolaro², Silvia Berlanga de Moraes Barros¹ and Silvyia Stuchi Maria-Engler^{1*} **Skin irritation testing in an open source protocol of reconstructed human epidermis (RHE)** – Submetido para ALTEX – 2016

2. **Tatiana do Nascimento Pedrosa**, Evelyne De Vuyst¹, Abdallah Mound¹, Catherine Lambert de Rouvroit¹, Silvyia Stuchi Maria-Engler² and Yves Poumay. **Plasma membrane cholesterol depletion combined to incubation with interleukin-4 reproduce major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model** – Submetido para AODR (Archives of Dermatological Research) – 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Depto Análises Clínicas e Toxicológicas

August, 26th 2016.

Dr. Sonja von Aulock
ALTEX Editor

Dear Editor,

I would like to submit the the manuscript "Skin irritation testing in an open source protocol of reconstructed human epidermis (RHE)" for possible publication in the journal "Alternatives to Animal Experimentation - ALTEX".

The aim of this manuscript is present an open-source protocol that can be replicate in house for toxicological assays. This tool can provide autonomy and enable progress in the establishment of alternative methods to animal testing in emerging countres which the industries face customs problems, often prevent the importation of commercial kits. Thus, this work aimed at the development of a reconstructed human epidermal model (herein denominated USP-RHE), that can be used for assessing skin irritation in vitro.

We declare that this work is unpublished. It strictly follows all ethical procedures and it has not been submitted to any other journal for publication. Moreover, we are aware that, if the manuscript is accepted for publication, copyright now belong to the ALTEX.

Finally, we authorize, if necessary, the reformulation of wording and style.

Looking forward to hearing from you,

A handwritten signature in blue ink. The signature is cursive and stylized, appearing to read 'Silvyia Stuchi Maria-Engler'. It starts with a large, looped 'S' and ends with a long, horizontal stroke.

Silvyia Stuchi Maria- Engler
Head of Department
Clinical Chemistry and Toxicology
School of Pharmaceutical Sciences
University of São Paulo
Brazil

Skin irritation testing in an open source protocol of reconstructed human epidermis (RHE)

Tatiana do Nascimento Pedrosa¹, Carolina Motter Catarino¹, Paula Comune Pennacchi¹, Sílvia Romano de Assis¹, Fabrícia Gimenes², Márcia Edilaine Lopes Consolaro², Silvia Berlanga de Moraes Barros¹ and Silvyia Stuchi Maria-Engler^{1*}

¹ Clinical Chemistry & Toxicology Department, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 17, 05508-000, São Paulo, Brazil

² Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil

Correspondence to:

^{1*}Silvyia Stuchi Maria-Engler

Skin Biology and Melanoma Group

Dept. of Clinical Chemistry and Toxicology

School of Pharmaceutical Sciences

University of São Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, USP

Sao Paulo, SP, 05508-000

e-mail – silvyia@usp.br

Abstract

Different models of reconstructed human epidermis (RHE) are currently validated to assess skin irritation *in vitro* and replace the Draize test. The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) encourages the development of new models and, for this purpose, offers a thorough guideline on quality control parameters (OECD TG 439). The development of a new RHE model is a challenge for many laboratories, representing a potential gain of autonomy and improvement of technological knowledge. This work aimed to develop a RHE model (i.e. USP-RHE) for *in vitro* skin irritation assays, according to OECD TG 439. The developed model presents a well-differentiated epidermis similar to the Validated Reference Method (VRM) and to native human epidermis. Quality parameters, i.e. optical density of negative control, tissue integrity and barrier function, were similar to VRM and in accordance with OECD TG 439. Moreover, the USP-RHE model was shown to have good specificity, sensitivity and accuracy at about 92.3% (12/13) when compared to *in vivo* UN GHS classification. Thus, we demonstrated that USP-RHE model attends to all OECD TG 439 criteria and is ready to be used by private and public laboratories and companies for future validation studies as a promising open-source protocol.

Keywords: Irritation assays, RHE, OECD, New skin models.

1. Introduction

The development of new *in vitro* skin models and new methodologies follows a global trend to reduce or replace animal tests and it is essential for worldwide dissemination of alternative methodologies (Lemper et al., 2014; Jung et al., 2014). Since March 2013, it is no longer possible to carry out animal testing for cosmetics in the European Union; for this reason, hazard assessment, such as the skin Draize test, have been progressively replaced by models such as the reconstructed human epidermis (RHE) (Lemper et al., 2014).

Currently, the Rheinwald and Green modified culture medium (RGM), originally described in 1975, is still widely used (Abdel-Naser et al., 2005; Lamb and Ambler, 2013). Rheinwald and Green (1975) were the first to demonstrate that keratinocytes could grow and form stratified colonies, but failed to achieve a normal differentiation program. Later, Prunieras et al. (1983) demonstrated that exposure of these cells to an air-liquid interface allowed the development of a fully differentiated epidermis (Frankart et al., 2012).

Overall, there is an urgent need for a protocol that allows the development of an in-house RHE model for research, in order to overcome the high cost of commercial kits and to obtain greater control of culture parameters (Poumay et al., 2004; 2006; de Vuyst et al., 2014). In this context, the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) encourages the production of new RHE models, providing a detailed quality control and performance guideline entitled OECD TG 439 (TG 439 Annex I), which includes standard criteria for cell viability, barrier function, morphology and reproducibility (Jung et al., 2014).

For cosmetic industries in developing countries such as Brazil, where customs problems often prevent the importation of commercial kits, an open-source protocol that can be used for toxicological assays is critical (De Wever et al., 2015). This tool can provide autonomy and enable progress in the establishment of alternative methods to animal testing. Thus, this work aimed at the development of a RHE model (herein denominated USP-RHE), using the RGM with modifications, that can be used for assessing skin irritation *in vitro*.

2. Material and Methods

2.1. Cell culture

Normal human epidermal keratinocytes (NHEK) and normal human fibroblasts (NHF) were derived from donated foreskin samples obtained at the University of São Paulo Hospital (Hospital Universitário – HU/USP). Cells were isolated as previously described (Pennacchi et

al., 2015), under approval of the local Ethics Committee (HU CEP Case No. 943/09 and CEP FCF/USP 534).

NHEK cells were grown in KGM-Gold Bullet Kit medium (Lonza, Walkersville, MD), in a humidified atmosphere with 7.5% CO₂ at 37°C; passages 1–3 were used for the experiments. NHF were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Invitrogen), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Invitrogen); passages 1–5 were used for the experiments.

2.2. Primary cells quality control and contaminants evaluation

The assessment of microbiological contaminants in the primary cultures used in this study was performed at Faculty of Pharmacy of the State University of Maringá – PR, Brazil, according to Gimenes and Medina et al. (2014). All primary cells were evaluated for the presence of *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, herpes simplex virus (HSV-1) and HSV-2, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Human papillomavirus (HPV) by multiplex PCR technique. RT-PCR technique was used for detection of Human T-cell lymphotropic virus-1 (HTLV-1), HTLV-2, human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) and HIV-2, human hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus and Human hepatitis B virus (HBV). All primary cells used in this study were free of contaminants.

2.3. Reconstructed human epidermis (RHE) model

NHEKs were seeded in Corning transwell® culture inserts (2.5×10⁵ cells/insert) previously coated with collagen IV (0.3 mg/mL) and were kept submerged in a 3:1 DMEM and HAM mixture with 5 µg/mL insulin, 0.4 µg/mL hydrocortisone, 5 µg/mL transferrin, 0.1 nM cholera toxin, 2 ng/mL TGF-α, 1 ng/mL EGF and 5 % of conditioned medium obtained from primary fibroblasts cultured for 24 h at high confluence (~80%). The inserts were then raised and maintained at the air–liquid interface for 11 days. On day 9, RHE samples were transferred and maintained in a 5% CO₂ incubator with low humidity (~50%). Medium was replaced every 2 days.

2.4. Quality control of the RHE model

2.4.1. Morphology and immunohistochemistry

RHE samples were fixed in 10% formaldehyde, at 4 °C, dehydrated and embedded in paraffin. Slides were stained with hematoxylin and eosin for morphological evaluation. For

immunohistochemistry (IHC) analysis, antigen recovery was performed twice in citrate buffer pH 6.0 for 5 min at 95°C. The samples were incubated with primary antibodies for cytokeratin 10 (CK10 – 1:300) or cytokeratin 14 (CK14 – 1:300) (Abcam-1421 and Abcam-7800, Abcam Cambridge, UK) overnight at 4°C in a moist chamber, and subsequently incubated for 1 h at room temperature with specie-specific secondary antibodies. All images were obtained by optical microscopy and analyzed by NIS-Elements software (Nikon Instruments, Melville, NY) according to Pennacchi et al. (2015).

2.4.2. Cell viability of negative control

The cell viability assay for the negative control was performed according to OECD TG 439 using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay. Tissues were exposed to phosphate buffered saline (PBS), washed with PBS, and further incubated with 500 µL of MTT (1 mg/mL) at 37 °C in a 5 % CO₂ incubator. After 3 h incubation the excess of MTT was removed and the tissue washed with PBS. Reduced formazan was extracted by incubation with 2 mL of isopropanol for 2 h. Subsequently, 200 µL of the extraction solution were transferred to a 96-well plate, and the Optical Density (OD) of the resulting purple dye was measured at 570 nm using an ELISA plate reader (BioTek Instruments INC., USA).

2.4.3. Evaluation of barrier function - Exposure Time 50 (ET₅₀) and Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀)

Evaluation of tissue integrity and barrier function of the RHE was performed by assessing the exposure time required for a cytotoxic benchmark chemical to reduce cell viability by 50% (ET₅₀) and the concentration at which it reduces cell viability by 50% (IC₅₀), according to OECD TG 439. For ET₅₀ evaluation, tissues were exposed to the 1% Triton X-100 for 0, 4, 8, 12 and 16 h; for IC₅₀ evaluation, tissues were exposed to sodium dodecyl sulphate (SDS) for 18h at four different concentrations (0; 0.625; 1.25; 2.5; 5 mg/mL). Cell viability was assessed by the MTT assay as described above.

2.4. Applicability of the USP-RHE protocol for skin irritation testing

To evaluate the applicability of USP-RHE for skin irritation testing, we used the EpiSkin™ protocol (OECD TG 439) with some modifications. After 2 h of pre-incubation, tissues were removed from the incubator and immediately exposed to materials with known

skin irritation properties, wherein 30 μ L of liquid materials or 30 μ g of solid materials were dispensed directly onto the tissue surface (**Table 1**). Sterile forceps were used to tilt the insert and gently spread liquid materials. Application of solid materials was preceded by 30 μ L of PBS applied directly onto the insert. SDS 5% was used as the positive control, as recommended by the VRM. All test substances were supplied by Sigma-Aldrich. After 15 min of exposure to the test substance, tissue was rinsed with PBS and maintained in the incubator for further 42 h. After this period, tissue was transferred to 24-well plates and incubated with MTT (1 mg/mL) for 3 h at 37°C and 5% CO₂. Next, tissue was rinsed again with PBS and transferred to a new plate, prefilled with 2 mL of isopropanol for extraction of reduced formazan, at room temperature, for 2h. Extraction solution (200 μ L) was transferred to a 96-well plate, and the OD of the resulting purple dye was measured at 570 nm using an ELISA plate reader. Isopropanol was used as a blank.

2.5. Statistics

All experiments were performed in triplicate. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), and significant mean differences were determined using multiple comparisons by the t-test.

3. Results

The developed model, USP-RHE, is a well-differentiated epidermis that presents expression of epidermal differentiation markers (CK10 and CK14) and morphology similar to native human skin (**Figure 1**). Morphology is one of the main parameters of quality control described in the OECD TG 439 and was herein evaluated accordingly.

Moreover, tissues treated with the negative control (PBS) were shown to be stable in culture, since viability measured by the MTT assay was constant throughout the experiment, which is in accordance with OECD TG 439 quality control parameters. The extraction solvent (isopropanol) used for the MTT assay, showed sufficiently low OD (<0.1) in all tests performed, and negative control tissues resulted in OD values ≥ 0.6 and ≤ 1.7 , within the lower and upper acceptability ranges, respectively, as recommended by the VRM (**Table 2**).

Tissue integrity of USP-RHE after exposure to 1% Triton X-100 for different time periods or SDS at different concentrations was assessed by determining the ET₅₀ (**Figure 2A**) and IC₅₀ values (**Figure 2B**), respectively, using the MTT assay. Our model presented adequate

resistance to these cytotoxic chemicals, with ET_{50} intervals of 7.4 – 8.9 h and IC_{50} intervals of 2.1 – 3.4 mg/mL, indicating a barrier function similar to the VRM (**Table 3**).

After confirming that the USP-RHE presented all quality control parameters required by the OECD guideline for skin irritation testing, we evaluated whether our model was useful to discriminate between irritant and non-irritant materials. As shown in **Figure 3** and **Table 4**, results from our model were comparable with those obtained *in vivo* and with the VRM.

According to OECD TG 439 recommendations, RHE models for skin irritation assays must present specificity $\geq 70\%$, sensitivity $\geq 80\%$ and accuracy $\geq 75\%$, in order to be considered acceptable (Jung et al., 2014; OECD). **Table 4** shows that Cinnamaldehyde is classified as non-irritant in *in vivo* assays (no UN GHS Category); however, in USP-RHE, it was determined as a false positive, indicating that our model presents 92.3% (10/11) of specificity, sensitivity and accuracy. In relation to the VRM, USP-RHE presented equivalent classifications for all substances, thus indicating 100% of specificity, sensitivity and accuracy according to OECD TG 439 guideline (**Table 4**).

Discussion

We developed a well-differentiated RHE model, presenting similar morphology to native human skin and adequate quality control parameters required by OECD TG 439, including microbiological screening and can be used for *in vitro* skin irritation assays. Laboratories that produce RHE models must control every RHE lot regarding cell viability, barrier function, histology and sterility, i.e. viral (HIV I and II, Hepatitis B and C), bacterial and fungal contamination (Portes et al., 2002; Molinari et al., 2013).

The *stratum corneum* of RHE models must provide barrier-function properties similar to human native skin, in order to be applied as a valuable tool for cutaneous toxicity evaluation (Portes et al., 2002; Molinari et al., 2013). According to Hoffman et al. (2005), tolerance to detergents is one of the main indicators of a RHE with intact barrier. Our study shows that USP-RHE presents proper tolerance to 1% Triton X-100 and SDS, similar to the VRM, suggesting that this model has a sufficiently robust *stratum corneum* to resist fast penetration of chemical products.

The capacity to distinguish between irritant and non-irritant chemicals also reflects the quality of the barrier-function of the RHE model (Coquette et al., 1999). We compared our model with the VRM and observed similar morphology and response profile to OECD TG 439 reference chemicals for *in vitro* skin irritation assays (Jung et al., 2014). USP-RHE can satisfactorily distinguish these substances with predictions similar to the VRM, e.g. SkinEthic

(Coquette et al., 1999), suggesting that this model is ready to be validated in an inter-laboratorial skin irritation assay.

In vitro models allow to reduce the number of animals used in laboratory assays; furthermore, they are highly reproducible and present low variability (Poumay and Coquette, 2007). The RHEs method represents objective quantitative tools to determine the skin irritation potential of a substance compared to the subjective evaluation provided by animal tests (Chatterjee et al., 2006).

Moreover, USP-RHE is a promising model not only for *in vitro* skin irritation assays but also for application in other areas of research as an alternative to animal testing. RHE models have an important potential role in basic and applied research and in chemical and cosmetic industry (Poumay and Coquette, 2007). In the last years, several studies were performed to search for new alternative methods to animal use for skin and ocular irritation assays and, for this reason, some alternatives to the Draize test are now available (Vinardell and Mitjans, 2007). Brazil intends to ban animal use in research in the near future and, in an attempt to reduce these trials, started with the recognition of some validated OECD alternative methods to animal use (Brasil, 2014), including two RHE models (OECD TG 431 and 439). However, the validated models are produced abroad and are inaccessible by importation in Brazil due to logistics and customs issues (De Wever et al., 2015). Thus, the development of new RHE models provides independence for small companies. Moreover, larger companies producing a single model can also benefit from this initiative, since it is desirable to have more than one model available, from different sources, meeting the same requirements. If an *in vitro* model is no longer marketed, temporarily or permanently, the company would be forced to rapidly adapt to a new model (Poumay and Coquette, 2007). Notably, for a new model proposal requiring validation, regardless of the purpose or type of study, prioritization must be given to the scientific aspects of this process rather than to the political ones (Vinardell and Mitjans, 2007).

All results presented in this work demonstrate that USP-RHE model is in concordance with *in vivo* data and with the VRM classification for skin irritation, meeting all requirements to be subjected to inter-laboratory validation tests. This model was sponsored by the Brazilian government through National Network for Alternative Methods (RENAMA) and by FAPESP. In addition, USP-RHE certainly represents an advance in Brazilian alternative methods and has great potential to be recognized worldwide and now is ready for evaluation in an inter-laboratory validation study.

Conflicts of interest

None

Acknowledgments

The authors thank the Histological Techniques Sector of ICB-USP for the technical support. Financial support was provided by FAPESP (Grants# 2013/12682-9, 2011/07441-7, 2011/14327-6; 2011/22812-1; 2013/00735-0; 2014/ 24400-0), CNPq- INCT-if and RENAMA. Also thanks to Dr. Bianca Ferruccio for English revision.

REFERENCES

- Abdel-Naser, M. B., Abdallah, M., Almeida Jr., H. L. et al. (2005). Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. EDOJ 1(2).
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Available: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0234/234796.pdf>. Access on: Mar/2015.
- Chatterjee, A., Jayachandra Babu, R., Klausner, M. et al. (2006). *In vitro* and *in vivo* comparison of dermal irritancy of jet fuel exposure using EpiDerm™ (EPI-200) cultured human skin and hairless rats. Toxicol Lett 167(2), 85–94.
- Coquette, A., Berna, N., Vandenbosch, A. et al. (1999). Differential Expression and Release of Cytokines by an *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis Following Exposure to Skin Irritant and Sensitizing Chemicals. Toxicol In Vitro 13, 867-877.
- De Wever, B., Goldberg, A., Eskes, C. et al. (2015). “Open Source”-Based Engineered Human Tissue Models: A New Gold Standard for Nonanimal Testing Through Openness, Transparency, and Collaboration, Promoted by the ALEXANDRA Association. Applied In Vitro Toxicol, 1(1). doi: 10.1089/aivt.2014.0011
- De Vuyst, E., Charlier, C., Giltair, S. et al. (2014). Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. Methods Mol Biol 1195:191-201.
- Frankart, A., Malaisse, J., De Vuyst, E. et al. (2012). Epidermal morphogenesis during progressive *in vitro* 3D reconstruction at the air-liquid interface. Exp Dermatol 21:871-5.
- Gimenes, F., Medina, F. S., Abreu, A. L. et al. (2014). Sensitive Simultaneous Detection of Seven Sexually Transmitted Agents in Semen by Multiplex-PCR and of HPV by Single PCR. PLoS ONE, 9(6):e98862.
- Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S. et al. (2005). Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) — A new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing. Toxicol In Vitro 19, 925–929, 2005.
- Jung, K-M., Lee, S. H., Jang, W. H. et al. (2014). KeraSkin™-VM: A novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. Toxicol In Vitro 28, 742-750.
- Lamb, R., Ambler, C. A. (2013). Keratinocytes Propagated in Serum-Free, Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model. Plos One, 8:8.
- Lemper, M., De Paepe, K., Rogiers, V. (2014). Practical problems encountered during the cultivation of an open-source reconstructed human epidermis model on a polycarbonate membrane and protein quantification. Skin Pharmacol Physiol 27(2), 106-12.
- Molinari, J., Eskes, C., Andres, E. et al. (2013). Improved procedures for in vitro skin irritation testing of sticky and greasy natural botanicals. Toxicol In Vitro, 27(1):441-50.
- OECD. Test N.o 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. doi: 10.1787/9789264242845-en.
- Pennacchi, P. C., de Almeida, M. E., Gomes, O. L. et al. (2015). Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. Tissue Eng Part A. 21(17-18):2417-25. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0009.
- Portes, P., Grandidier, M. H., Cohen, C. et al. (2002). Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicol In Vitro. 16(6):765-70
- Poumay, Y., Coquette, A. (2007). Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. Arch Dermatol Res 298:361-9.
- Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S. et al. (2004). A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. Arch Dermatol Res 296:203-11.

- Prunieras, M., Regnier, M., Woodley, D. (1983a). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 81:28s-33s.
- Rheinwald, J. G., Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-43.
- Vinardell, M. P., Mitjans, M. (2008). Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. *J Pharm Sci* 97(1), 46–59.

Table 1– Parameters from protocols validated by the OECD TG 439 in comparison with parameters defined for the USP reconstructed human epidermis model (USP-RHE).

Procedure	EpiSkin™ (SM) *	EpiDerm™ SIT (EPI 200) *	SkinEthic RHE™ *	LabCyte EPIMODEL2 4 SIT *	USP-RHE
Pre-incubation					
Incubation time	18 –24 h	18 –24 h	< 2 h	15 – 30 h	< 2 h
Medium volume	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL	0.5 mL
Chemical application					
Negative control	PBS	DPBS	PBS	DPBS	PBS
Positive control	SDS 5 %	SDS 5 %	SDS 5 %	SDS 5 %	SDS 5 %
Volume (liquid chemicals)	10 µL (26 µL/cm ²)	30 µL (47 µL/cm ²)	16 µL (32µL/cm ²)	25 µL (83µL/cm ²)	10 µL (26 µL/cm ²)
Amount (solid chemicals)	10 mg (26 mg/cm ²) + DW (5µL)	25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25µL)	16 mg (32 mg/cm ²) + DW (10µL)	25 mg (83 mg/cm ²) + DW (25µL)	10 mg (26 mg/cm ²) + DW (5µL)
Nylon <i>mesh</i>	Not used	If necessary	Used	Not used	Not used
Total application time	15 min	60 min	42 min	15 min	15 min
Application temperature	RT	a) at RT for 25 min b) at 37 °C for 35 min	RT	RT	RT
Post-incubation					
Incubation time	42 ± 1 h	24 ± 2 h & 18 ± 2 h	42 ± 1 h	42 h ± 1 h	42 ± 1 h
Medium volume	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL	0.5 mL x 2
MTT assay					
MTT concentration	0.3 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL
Application time	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min	3 h ± 5 min
Extraction solvent	Acidic Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol
Solvent volume	2 mL	2 mL	700 µL	0.3 mL	2 mL
Extraction time	4 h or overnight	2 h	2 h	Overnight	2 h

RT: Room Temperature; DW: distilled water; DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline.

* Data obtained from OECD TG 439 and Jung et al. (2014).

Table 2 – Acceptability ranges for negative control OD values of USP-RHE and OECD TG 439 validated models for skin irritation testing.

Model	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
USP-RHE*	≥ 0.6	≤ 1.7
EpiSkin™ (SM) EpiDerm™ **	≥ 0.6	≤ 1.5
SIT (EPI-200)**	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE**	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT**	≥ 0.7	≤ 2.5

* Results represent independent experiments (n = 3) compared to control (p> 0.05).

** Results described in OECD TG 439

Table 3 – Comparison of barrier function between USP-RHE and OECD TG 439 validated models for skin irritation testing

	ET₅₀ (1% Triton X-100)	IC₅₀ (SDS)
USP-RHE*	7.4 – 8.9 h	2.1 – 3.4 mg/mL
EpiSkin™ (SM)**	-	1 – 3 mg/mL
EpiDerm™ SIT (EPI-200) **	4 – 8.7 h	-
SkinEthic™ RHE **	4 – 10 h	-
LabCyte EPI-MODEL24 SIT **	-	1.4 – 4 mg/mL

- Not available in OECD TG 439

* Results represent independent experiments (n = 3) compared to control (p> 0.05).

** Results described in OECD TG 439

Table 4 – Comparison between UN GHS category for skin irritation (*in vivo* data), Validated reference Methods (VRM) and USP-RHE model with regard to the evaluation of skin irritation according to OECD TG 439

Substance	CAS No.	Physical State	UN GHS Cat.	VRM	USP-RHE model
Naphthalene acetic acid	86-87-3	Solid	No	NI	NI
Isopropanol	67-63-0	Liquid	No	NI	NI
Methyl stearate	112-61-8	Solid	No	NI	NI
Heptyl butyrate	5870-93-9	Liquid	No	NI	NI
Diethyl phthalate	84-66-2	Liquid	No	NI	NI
Hexyl salicylate	6259-76-3	Liquid	No	NI	NI
Cinnamaldehyde	104-55-2	Liquid	No	I	I
Substance	CAS No.	Physical State	UN GHS Cat.	VRM	USP-RHE model
Cyclamen aldehyde	103-95-7	Liquid	R38	I	I
1-Bromohexane	111-25-1	Liquid	R38	I	I
5% Potassium hydroxide	1310-58-3	Liquid	R38	I	I
1-Methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	Solid	R38	I	I
Tetrachloroethylene	127-18-4	Liquid	R38	I	I
Heptanal	111-71-7	Liquid	R38	I	I

I = Irritant substance

NI = Non-irritant substance

Figure Legends

Figure 1 – Histological analysis of hematoxylin/eosin stained vertical paraffin sections of (A) native human epidermis and (B) USP-RHE model. (C) Immunofluorescent staining of USP-RHE model (Day 12) and human epidermis with cytokeratin 10 (CK10) and cytokeratin 14 (CK14) antibodies. Magnification = 20 X. Bar = 200 μ m.

Figure 2 – Evaluation of the integrity of USP-RHE barrier function. Viability of USP-RHE after exposure to (A) different concentrations of SDS (0, 0.625, 1.25, 2.5 and 5 mg/mL) for 18 h, and (B) 1% Triton X-100 for different time periods (0, 4, 8, 12 and 16 h).

Figure 3 – *In vitro* evaluation of skin irritation according to OECD GD 439. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments. (***) $p < 0.001$ when compared to negative control. C(-): Negative Control (PBS); C(+): Positive control (Sodium dodecyl sulfate - 5% SDS). KOH= Potassium hydroxide.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Growth factor combinations are essential for successful development of reconstructed human epidermis

Tatiana do Nascimento Pedrosa¹, Carolina Motter Catarino¹, Paula Comune Pennacchi¹, Evelyne de Vuyst², Catherine Lambert De Rovroït², Silvia Berlanga de Moraes Barros¹ Yves Poumay² and Silvy Maria-Engler^{1*}

¹Skin Biology Laboratory, Clinical Chemistry & Toxicology Department, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Cell and Tissue Laboratory-URPhyM-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium

***Correspondence Author:**

Silvy Maria-Engler, School of Pharmaceutical Sciences - Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 17, Sl. 114, University of São Paulo. CEP: 05508-000. São Paulo - SP.

Phone:

FAX:

E-mail: silvy@usp.br

Short title: Growth factors in organotypic skin cultures

Abbreviations: Reconstructed human epidermis (RHE), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Epidermal Growth Factor (EGF) and Transforming Growth Factor- α (TGF- α), EGF receptor (EGFR), tissue plasminogen activator (tPA), urokinase-type plasminogen activator (uPA), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-6 (IL-6), fibroblast growth factor 10 (FGF-10), Cholera Toxin (CT), Extracellular Matrix Components (ECM), European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL-ECVAM), Fetal Bovine Serum (FBS), Madin-Darby canine kidney (MDKC), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), HAM

ABSTRACT

Three-dimensional (3D) skin models have been widely used for replacement of animals. Moreover, reconstructed human epidermis (RHE) are of interest as a screening tool for toxicity and efficacy of drugs and chemicals, and to create in vitro models of human disease and tissue regeneration. Several models are commercially available, however, a reproductive protocol represents a challenge for an in-house generation of this model. This paper reviews the role of growth factors and conditions of cultures and suggests the best combination of the supplements. The interaction of supplements and culture conditions can successfully produce a well-differentiated epidermis independently of the used medium, allowing autonomy to laboratories.

Keywords: Keratinocytes, Skin, Epidermis equivalent, Open-source protocol, Organotypic cultures.

1 INTRODUCTION

The development of new in vitro skin models such as reconstructed human epidermis (RHE) are promising tools for reduce or replace animal testing (Jung *et al.*, 2014; Lemper *et al.*, 2014). RHE allows to evaluate some clinical reactions (Roguet *et al.*, 2000), overcome common monoculture limitations, such as poor solubility and stability of chemicals in aqueous solution and have been used for many studies (e.g. irritation, sensitization etc) (Poumay *et al.*, 2004). However, during the development of a model of RHE, researchers faces some challenges regarding culture mediums and conditions (e.g. cell density, use of lysis enzymes, etc) representing a limitation for the development of this 3D skin model (Lemper *et al.*, 2014).

Although there are already many RHE commercially available, they are not available in some countries due to customs concerns. Besides that there is an urgent need for a protocol that allows the development of an RHE model for basic research, with greater control of culture parameters (e.g., culture conditions, origin of the cells, etc (De Vuyst *et al.*, 2014; Poumay and Coquette, 2006). In this context, the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) encourages the production of new RHE models, providing a detailed quality control and performance guideline (OECD TG 439 - Annex 3) (Jung *et al.*, 2014).

For cosmetic, pharmaceutical and pesticide industries and research laboratories, in special, an open-source RHE protocol that can be used for toxicological/efficacy assays would strongly give them autonomy and contribute to give progress in the establishment of alternative methods to animal use. In this context, this present work aimed to describe the role of different growth factors and specific cultures conditions using the media combination proposed by the seminal paper of Rheinwald and Green (1975). Here, we are describing the development of an RHE model offering a reliable and an open-source protocol.

2. GROWTH FACTORS USED IN ORGANOTYPIC CULTURE

2.1. Hormones and proteins

- *Epidermal Growth Factor (EGF) and Transforming Growth Factor- α (TGF- α)*

EGF is a polypeptide involved in the maturation of the epithelium that binds to the EGF receptor (EGFR), a ligand of EGF-related cytokines such as (TGF- α). After treatment of epithelial cells with EGF, there is a remodeling of the actin skeleton, which may lead to retraction and rounding of the cells (Haase *et al.*, 2003). EGF is much more potent in cultured cells derived from newborn donors and seems to antagonize the terminal differentiation and increase the size of clonogenic and dividing cell populations (Rheinwald and Green, 1977).

TGF- α is an important autocrine growth factor regarded as having the same potency of EGF in stimulating the growth of normal keratinocytes and skin tumors (Turksen *et al.*, 1991). TGF- α is a potent mitogen that assists in the adhesion and spreading of keratinocytes on substrates (Ponec *et al.*, 1997; Woodley *et al.*, 1990) besides inducing the expression of interleukin-1 α , Keratinocyte Growth Factor (KGF) and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptors, which in turn are growth factors released by fibroblasts (Maas-Szabowski *et al.*, 2003). Moreover, TGF- α has a role in inhibiting proliferation of differentiated cells, but its action is not sufficient to induce them to differentiate (Fuchs, 1990). Together, TGF- α and EGF act to influence critical activities in inflammation and wound healing processes (Turksen *et al.*, 1991).

- Keratinocyte Growth Factor (KGF)

KGF is a multifunctional cytokine with specificity for epithelial cells, significantly influencing epithelial repair (Bader and Kao, 2009; Escamez *et al.*, 2008). It is a monomeric peptide secreted primarily by mesenchymal cells such as fibroblasts and microvascular endothelial cells (Koria and Andreadis, 2007) but not by epithelial cells (Brauchle *et al.*, 1995).

KGF largely controls keratinocytes proliferation, migration and cytoskeletal rearrangement (Ceccarelli *et al.*, 2007) besides inducing high expression of antimicrobial peptides in epidermal keratinocytes, suggesting that it may play a role in the skin innate immunity (Koria and Andreadis, 2007). KGF expression is upregulated in psoriasis and in serum-stimulated fibroblasts (Koria and Andreadis, 2007).

- Insulin

Insulin and transferrin are the most common growth factors in serum-free cultures (Keenan *et al.*, 2006b) and with triiodothyronine they improve growth rates and reduce from 20% to 10% the requirement of serum in the culture (Parkinson and Yeudall, 2002).

Insulin plays a key role in glucose transport to cells (Conover *et al.*, 1985; Mainzer *et al.*, 2014), is a potent mitogen and its use is essential in medium formulations (Keenan *et al.*, 2006a). It is used at relatively high concentrations in the culture medium (1-10 µg/mL) due to rapid loss of biological activity (Gstraunthaler, 2003). Insulin and its degradation products may also mimic the stimulatory activity of peptide-related growth factors, such as insulin-like growth factors (IGF) and somatomedins (Gstraunthaler, 2003). Among other roles in cell culture, insulin acts on lipid metabolism, amino acid uptake and DNA synthesis (Conover *et al.*, 1985).

- Transferrin

Transferrin is a serum protein responsible for cellular iron transport (Gstraunthaler, 2003), required for cells metabolic growth processes (Keenan *et al.*, 2006a; Keenan *et al.*, 2006b). It is the most common iron chelator used in serum mediums and is essential to support the growth of MDCK cells in serum-free conditions (Keenan *et al.*, 2006b). Transferrin assists in the reduction of toxic levels of reactive oxygen species (ROS) that may be generated by non-protein-bound iron (Mainzer *et al.*, 2014), regulates the bioavailability of iron in the cells and oxygen transport as well as DNA synthesis and electrons transport (Keenan *et al.*, 2006b).

- Hydrocortisone

Glucocorticoids inhibit fibroblasts growth and allow clonal growth of human keratinocytes without a 3T3 feeder layer (Myohanen *et al.*, 2001; Peehl and Ham, 1980). Hydrocortisone, the most important human glucocorticoid, is essential to maintain the proliferation rate for colony morphology and differentiation when keratinocytes are subcultured (Rheinwald and Green, 1975), besides preventing deterioration of the 3T3 feeder layer (Pera and Gorman, 1984). In dermal equivalent model, higher concentrations of hydrocortisone inhibit hyaluronate synthesis, usually increased (Deshpande *et al.*, 2013).

Hydrocortisone reduces tissue plasminogen activator (tPA) production to undetectable levels and when absent, increase urokinase-type plasminogen activator (uPA), which make cells become elongated and display a fibroblast phenotype (Myohanen *et al.*, 2001). When combined hydrocortisone, EGF, and cholera toxin increase the clonogenic fraction, growth rate of cell population and culture lifespan (Parkinson and Yeudall, 2002).

2.2. Pharmacological agents

- *Modifiers of cAMP levels*

Human keratinocytes express only beta-adrenergic receptors 2 (beta2AR) that when stimulated lead to a transient increase in intracellular calcium concentration, thus changing their differentiation. The activation of beta2AR by epinephrine increase intracellular calcium levels and induce differentiation and the activation by isoproterenol increases intracellular concentrations of cAMP inhibiti the migration of keratinocytes in a concentration-dependent manner (through cAMP-independent signaling) (Sivamani *et al.*, 2007b). In parallel, cholera toxin (CT) seems to oppose to the tendency of keratinocytes to grow and can therefore, hinder the onset of terminal differentiation through increase of cAMP levels.

CT is related with an abnormal expression of epidermal differentiation markers cytokeratins 1 (CK1) and 10 (CK10) that were expressed very early in the epidermal differentiation process (CK10 expression precedes the expression of CK1 *in vitro* as opposed to what occurs *in vivo*). Upon removal of the CT from the medium, the tissue presented a more regular suprabasal distribution of cytokeratins, suggesting that the elevation of cAMP caused by CT interfere on the control of specific differentiation genes instead of increasing keratinocyte proliferation under these conditions (Stark *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1982).

2.3. Vitamins

- *Vitamin C and Vitamin E*

Oxidative stress induces morphological alterations in organotypic cultures. Cells exposure to H₂O₂ promotes the increase of cell proliferation and tissue hyperplasia (Royack *et al.*, 2000). Vitamin E prevents the spread of lipid peroxidation of membranes (Diplock, 1991) and provides initial protection from oxidative damage (Royack *et al.*, 2000).

Vitamin C (VitC) or ascorbic acid is a major antioxidant in the aqueous cellular compartment (and the only essential one) that, together with vitamin E (the most important antioxidant in the liposoluble compartment), plays an important role in the prevention of oxidative stress in the skin. Although work in separate compartments, vitamin C and E act synergistically (Rozman *et al.*, 2009).

Moreover, vitC stimulates collagen production in cultured human fibroblasts without apparent alterations in the degradation of newly synthesized intracellular pro-collagen (Geesin *et al.*, 1988). Medium supplementation with this vitamin significantly improves the barrier characteristics of the RHE with an increase in ceramides and the percentage of total lipids to more closely resemble ceramide content and distribution *in vivo* (Ponec *et al.*, 1997) and favors the growth of skin and mesenchymal cells, which increases the production of Extracellular Matrix Components (ECM) without the addition of exogenous materials (Sridhar *et al.*, 2015).

2.4. Ions

- Calcium

Calcium concentration in the culture medium usually ranges between 0.3 and 2 mM (Poumay and Coquette, 2006) and is important for many differentiation processes, including stratification, desmosome adhesion and activation of epidermal transglutaminase (Watt, 1984). The reduction of calcium levels in the medium induces shifting to keratinocytes proliferation rather than differentiation, without altering the ability of cell division and growth (Hennings *et al.*, 1980; Nakamura and Fukami, 2009; Watt, 1984). In culture medium with low calcium levels, keratinocytes express cytokeratins of the germinal basal layer, i.e. CK5 and CK14 (Abdel-Naser *et al.*, 2005).

The activity of this ion is related to changes in cell architecture and not in gene expression *per se* (Fuchs, 1990). Importantly, the calcium gradient (from lower to higher concentration, from viable cell layers to the stratum granulosum) and pH gradient (neutral pH in the region of viable cells and more acidic pH in the stratum corneum), characteristic of human skin help to maintain the homeostasis of the epidermal permeability (Sun *et al.*, 2015b).

2.5. Substrates

- Collagen IV

Under sub-optimal growth conditions, components of the ECM can modulate the growth of keratinocytes and facilitate the adhesion of adhesion-dependent cells (Kleinman *et al.*, 1981; Kleinman *et al.*, 1987; Woodley *et al.*, 1990). Collagen IV is a basement membrane protein present at the dermal-epidermal junction that assists in anchoring the epidermis to the dermis (Bellas *et al.*, 2012). Although normally secreted by keratinocytes, the use of type IV collagen obtained from the placenta in the culture media can improve the attachment, growth,

and differentiation of these cells (Tinois *et al.*, 1991). Keratinocytes cultured on collagen IV are capable of forming an epidermis at higher passage numbers than cells grown in the absence of this protein (Coolen *et al.*, 2007)

Additionally, epidermal cells adhere better to surfaces coated with type IV collagen while fibroblasts adhere well to all types of collagen; however, fibronectin can improve fibroblasts adhesion to collagen (Dawson *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1979). Murray *et al.* (1979) have shown that epidermal cells formed a multilayer epidermis with scaly appearance, displaying desmosomes, keratin filaments, and keratohyalin granules over a period of 12 days in culture on collagen IV, demonstrating that specific cell-collagen interactions can drive cell growth and differentiation to normal tissue architecture and function.

2.6. Fibroblasts conditioned medium (FCM)

Fibroblasts present numerous functions in the synthesis and deposition of ECM components. Furthermore, they play an important role in the proliferation and migration as well as in autocrine and paracrine interactions with neighboring cells (Brohem *et al.*, 2011). These dermal cells release a multitude of growth factors that induce keratinocytes proliferation *in vivo* (normal skin) and *in vitro* (reconstructed skin) such as KGF, GM-CSF, interleukin-6 and fibroblast growth factor 10 (FGF-10) (Pajoum Shariati *et al.*, 2009). These growth factors stimulate keratinocytes to release interleukin-1 and hormones related to parathyroid hormone, which in turn induces KGF release by fibroblasts causing direct activation of keratinocytes (Mainzer *et al.*, 2014). In addition to promoting keratinocyte differentiation, secreted soluble factors induce expression of a variety of basement membrane proteins such as laminin V, nidogen and collagens type IV and VII (El Ghalbzouri and Ponec, 2004a; Ng and Ikeda, 2011).

Moreover, the use of conditioned medium in addition to large amounts of collagen stimulates the adhesion of epithelial cells in the absence of serum (Terranova *et al.*, 1980).

According to El Ghalbzouri and Ponc (2004), such supplement medium alone would be sufficient to regulate the proliferation and differentiation of cultured keratinocytes, without requiring co-culture with fibroblasts.

2.7. Low humidity

Exposure to low humidity conditions stimulates epidermal DNA synthesis within 12 hours doubling the original level of DNA and maintaining the increased synthesis for up to 5 days (Ashida *et al.*, 2001; Denda, 2000). Low humidity levels also have a significant effect on trans-epidermal water loss and barrier function of the RHE without inducing morphological changes (Mak *et al.*, 1991a; Nolte *et al.*, 1993b; Sun *et al.*, 2015b) with an increase of corneodesmosomes density (Sun *et al.*, 2015b) and no clear change in lipid composition content in stratum corneum (Nolte *et al.*, 1993b).

2.8. Serum-containing medium versus serum-free mediums

Traditionally, organotypic cultures have been developed depending on growing serum-containing media and/or Bovine Pituitary Extracts (BPE) (Ng and Ikeda, 2011).

Animal serum supplementation of media is essential for cell growth, metabolism and proliferation (Brunner *et al.*, 2010). FBS is a complex mixture of different factors such as growth factors, proteins, vitamins, oligoelements, hormones, etc (Keenan *et al.*, 2006a; Keenan *et al.*, 2006b). However, its use introduces undefined elements that are disadvantageous for pharmacological tests and clinical applications (Ng and Ikeda, 2011).

Low amounts of glucocorticoids (e.g. hydrocortisone) requires the reduction of serum in culture medium, because this could lead to tPA synthesis by keratinocytes, thus hindering their growth (Peehl and Ham, 1980). In the absence of serum, only small amounts of urokinase

are found, and its effects on tPA activity are not clear (Myohanen *et al.*, 2001). Moreover, in serum-containing mediums, the use of inactivated serum (heated at 56 °C for 30 minutes) is necessary for elimination of heat-sensitive factors such as complement proteins that can exert growth inhibiting activity doing a significant increase in epidermal thickness (Hasskarl *et al.*, 2006; Lako *et al.*, 2013).

The use of FBS is controversial for several reasons such as animal suffering, phenotypic differences and possibility of contamination with various agents (e.g. Mycoplasma sp.) (Keenan *et al.*, 2006a; Keenan *et al.*, 2006b). In this regard, since 2008, the European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL-ECVAM) has strongly recommended the use of serum-free medium substitutes for both new and existing *in vitro* methods (van der Valk *et al.*, 2010).

3. RECONSTRUCTION OF HUMAN EPIDERMIS *IN VITRO* USING DIFFERENT MEDIUMS

The first step in the development of a RHE is the proper isolation and cultivation of keratinocytes. The first ones to successfully describe how to perform this cultivation were Rheinwald and Green (1975) using a feeder layer of 3T3 irradiated cells. They demonstrated that this feeder layer increase plating efficiency and stimulates the keratinocytes growth which gradually replace the feeder cells. Furthermore, they showed that the proliferation and culture lifespan can be increased by adding various supplements in the culture medium (i.e., insulin, hydrocortisone, cholera toxin, and epidermal growth factor, EGF). The feeder layer could also be obtained with human dermal fibroblasts (Limat *et al.*, 1989; Limat *et al.*, 1990)

After the publication of Rheinwald and Green, the isolation and propagation of primary keratinocytes from human skin has been developed through the use of feeder layers (Rasmussen

et al., 2013). They demonstrate that keratinocytes could grow and form stratified colonies (Rheinwald and Green, 1975), however, an abnormal differentiation program was observed under these conditions. Later, Prunieras and colleagues (1983) demonstrated that exposure of keratinocytes to the air-liquid interface allowed the development of a fully differentiated epidermis (Frankart *et al.*, 2012; Prunieras *et al.*, 1983a). Since then, there have been many advances in the cultivation of human keratinocytes in monolayer as two-dimensional to three-dimensional organotypic culture and currently, new alternatives that not require the use of feeder layer are available commercially as Keratinocyte Growth Medium ® (Lonza, Walkersville, MD) and EpiLife® (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Rasmussen *et al.*, 2013).

Currently, modified culture conditions originally described by Rheinwald and Green (1975) are still widely used (Abdel-Naser *et al.*, 2005; Lako *et al.*, 2013). Nevertheless, efforts are being made to develop culture media that avoid the use of serum and feeder layer (Abdel-Naser *et al.*, 2005; Frankart *et al.*, 2012; Lako *et al.*, 2013), as well as to establish culture conditions that mimic normal expression of differentiation markers (Frankart *et al.*, 2012). Many serum-free and feeder layers-free mediums have already been developed and are commercially available. Such mediums support propagation and expansion of keratinocytes in two-dimensional tissue culture (Lako *et al.*, 2013).

Poumay and colleagues were the first to publish a complete protocol for the construction of RHE using a serum-free media and EpiLife® instead of the classical combination of DMEM:HAM-F12. This group demonstrated that a fully-differentiated epidermis can be developed in a polycarbonate filter using the combination of different growth factors and supplements (insulin, hydrocortisone, transferrin, epinephrine, EGF, KGF, Bovine Pituitary Extracts (BPE), calcium and vitamin C) (De Vuyst *et al.*, 2014). This combination allows the development of a fully-differentiated RHE with normal expression of differentiation markers using a variety of culture media commercially available what demonstrating that the correct

choose of vitamins, cytokines, ions and other medium components can successfully go out to meet the need when researchers develop organotypic cultures (**Fig.2**).

CONCLUSION

The combination of DMEM:HAM-F12 proposed by Rheinwald and Green for RHE development is still used by researchers throughout the world and it is accessible because the formulation of both media is well-known. The knowledge about the role of different supplements and culture conditions allows researchers to study the influence of these parameters on the epidermis reconstruction and this knowledge contributes to develop new RHE models and also *in vitro* models of skin disorders (e.g. atopic dermatitis, psoriasis etc).

RHE are undeniably a breakthrough for toxicological studies and also for the study of skin biology and keratinocytes behavior. Open-source protocols represents a methodological advance for researchers and for small companies with a perspective of autonomy in *in vitro* testing.

CONFLICT OF INTEREST

None

ACKNOWLEDGMENTS

Histological Techniques Sector of ICB I-USP for technical support whereas CNPq- INCT-if, RENAMA and FAPESP (Grants#: 2013/12682-9, 2011/14327-6, 2011/22812-1, 2013/00735-0) for financial support.

REFERENCES

- Abdel-Naser MB, Abdallah M, Almeida Jr. HL, *et al.* (2005) Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egyptian Dermatology Online Journal* 1.
- Ashida Y, Ogo M, Denda M (2001) Epidermal interleukin-1 alpha generation is amplified at low humidity: implications for the pathogenesis of inflammatory dermatoses. *The British journal of dermatology* 144:238-43.
- Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, *et al.* (2009) Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur J Dermatol* 19:107-13.
- Bader RA, Kao WJ (2009) Modulation of the keratinocyte-fibroblast paracrine relationship with gelatin-based semi-interpenetrating networks containing bioactive factors for wound repair. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 20:1005-30.
- Bae IH, Park JW, Kim DY (2014) Enhanced regenerative healing efficacy of a highly skin-permeable growth factor nanocomplex in a full-thickness excisional mouse wound model. *International Journal of Nanomedicine* 9:4551-67.
- Bellas E, Seiberg M, Garlick J, *et al.* (2012) In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials. *Macromolecular bioscience* 12:1627-36.
- Brauchle M, Fassler R, Werner S (1995) Suppression of keratinocyte growth factor expression by glucocorticoids in vitro and during wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 105:579-84.
- Brohem CA, Cardeal LB, Tiago M, *et al.* (2011) Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment cell & melanoma research* 24:35-50.
- Brunner D, Frank J, Appl H, *et al.* (2010) Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex* 27:53-62.
- Ceccarelli S, Cardinali G, Aspite N, *et al.* (2007) Cortactin involvement in the keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 promotion of migration and cortical actin assembly in human keratinocytes. *Experimental cell research* 313:1758-77.
- Conover CA, Hintz RL, Rosenfeld RG (1985) Comparative effects of somatomedin C and insulin on the metabolism and growth of cultured human fibroblasts. *J Cell Physiol* 122:133-41.
- oolen NA, Verkerk M, Reijnen L, *et al.* (2007) Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell transplantation* 16:649-61.
- Dawson RA, Goberdhan NJ, Freedlander E, *et al.* (1996) Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 22:93-100.

De Vuyst E, Charlier C, Giltaire S, *et al.* (2014) Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1195:191-201.

Denda M (2000) Influence of dry environment on epidermal function. *Journal of dermatological science* 24 Suppl 1:S22-8.

Deshpande M, Papp S, Schaffer L, *et al.* (2013) Hydrocortisone effect on hyaluronate synthesis in a self-assembled human dermal equivalent. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.

Diplock AT (1991) Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *The American journal of clinical nutrition* 53:189s-93s.

El Ghalbzouri A, Ponc M (2004a) Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 12:359-67.

El Ghalbzouri A, Ponc M (2004b) Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. *Wound Repair and Regeneration* 12:359-67.

Escamez MJ, Carretero M, Garcia M, *et al.* (2008) Assessment of optimal virus-mediated growth factor gene delivery for human cutaneous wound healing enhancement. *The Journal of investigative dermatology* 128:1565-75.

Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, *et al.* (2012) Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Experimental dermatology* 21:871-5.

Fuchs E (1990) Epidermal differentiation: the bare essentials. *The Journal of cell biology* 111:2807-14.

Geesin JC, Darr D, Kaufman R, *et al.* (1988) Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *The Journal of investigative dermatology* 90:420-4.

Gstraunthaler G (2003) Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex* 20:275-81.

Haase I, Evans R, Pofahl R, *et al.* (2003) Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *Journal of cell science* 116:3227-38.

Hasskarl J, Velupillai P, Munger K (2006) Increased in vitro lifespan of primary human keratinocytes correlates with decreased migration. *The Journal of investigative dermatology* 126:1179-81.

Hennings H, Michael D, Cheng C, *et al.* (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19:245-54.

Holbrook KA, Hennings H (1983) Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. *The Journal of investigative dermatology* 81:11s-24s.

Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, *et al.* (2011) Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:8797-802.

Jung KM, Lee SH, Jang WH, *et al.* (2014) KeraSkin-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28:742-50.

Keenan J, Pearson D, Clynes M (2006a) The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. *Cytotechnology* 50:49-56.

Keenan J, Pearson D, O'Driscoll L, *et al.* (2006b) Evaluation of recombinant human transferrin (DeltaFerrinTM) as an iron chelator in serum-free media for mammalian cell culture. *Cytotechnology* 51:29-37.

Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *The Journal of cell biology* 88:473-85.

Kleinman HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, *et al.* (1987) Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem* 166:1-13.

Koizumi H, Yasui C, Fukaya T, *et al.* (1991) BETA-ADRENERGIC STIMULATION INDUCES INTRACELLULAR CA⁺⁺ INCREASE IN HUMAN EPIDERMAL-KERATINOCYTES. *Journal of Investigative Dermatology* 96:234-7.

Koria P, Andreadis ST (2007) KGF promotes integrin $\alpha 5$ expression through CCAAT/enhancer-binding protein- β . *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 293:C1020-C31.

Lako M, Lamb R, Ambler CA (2013) Keratinocytes Propagated in Serum-Free, Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model. *PloS one* 8:e52494.

Lamb R, Ambler CA (2013) Keratinocytes Propagated in Serum-Free, Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model. *Plos One* 8:8.

Lemper M, De Paepe K, Rogiers V (2014) Practical problems encountered during the cultivation of an open-source reconstructed human epidermis model on a polycarbonate membrane and protein quantification. *Skin Pharmacol Physiol* 27:106-12.

Limat A, Hunziker T, Boillat C, *et al.* (1989) Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 92:758-62.

Limat A, Hunziker T, Boillat C, *et al.* (1990) Postmitotic human dermal fibroblasts preserve intact feeder properties for epithelial cell growth after long-term cryopreservation. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:709-12.

Maas-Szabowski N, Starker A, Fusenig NE (2003) Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . *Journal of cell science* 116:2937-48.

Mainzer C, Barrichello C, Debret R, *et al.* (2014) Insulin-transferrin-selenium as an alternative to foetal serum for epidermal equivalents. *International journal of cosmetic science* 36:427-35.

Mak VH, Cumpstone MB, Kennedy AH, *et al.* (1991a) Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. *The Journal of investigative dermatology* 96:323-7.

Mak VHW, Cumpstone MB, Kennedy AH, *et al.* (1991b) BARRIER FUNCTION OF HUMAN KERATINOCYTE CULTURES GROWN AT THE AIR-LIQUID INTERFACE. *Journal of Investigative Dermatology* 96:323-7.

Murray JC, Stingl G, Kleinman HK, *et al.* (1979) Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *The Journal of cell biology* 80:197-202.

Myohanen H, Virtanen I, Vaheri A (2001) Elimination of hydrocortisone from the medium enables tissue plasminogen activator gene expression by normal and immortalized nonmalignant human epithelial cells. *Biological chemistry* 382:1563-73.

Nakamura Y, Fukami K (2009) Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development. *Physiology (Bethesda, Md)* 24:332-41.

Ng W, Ikeda S (2011) Standardized, defined serum-free culture of a human skin equivalent on fibroblast-populated collagen scaffold. *Acta dermato-venereologica* 91:387-91.

Nolte CJM, Oleson MA, Bilbo PR, *et al.* (1993a) DEVELOPMENT OF A STRATUM-CORNEUM AND BARRIER FUNCTION IN AN ORGANOTYPIC SKIN CULTURE. *Archives of Dermatological Research* 285:466-74.

Nolte CJM, Oleson MA, Bilbo PR, *et al.* (1993b) Development of a stratum corneum and barrier function in an organotypic skin culture. *Archives of Dermatological Research* 285:466-74.

Pajoum Shariati SR, Shokrgozar MA, Vossoughi M, *et al.* (2009) In vitro co-culture of human skin keratinocytes and fibroblasts on a biocompatible and biodegradable scaffold. *Iranian biomedical journal* 13:169-77.

Parkinson EK, Yeudall WA (2002) The Epidermis. In: *Culture of Epithelial Cells* (John Wiley & Sons, Inc., 65-94.

Pasonen-Seppanen S, Suhonen TM, Kirjavainen M, *et al.* (2001) Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier. *Histochemistry and cell biology* 116:287-97.

Peehl DM, Ham RG (1980) Growth and differentiation of human keratinocytes without a feeder layer or conditioned medium. *In Vitro* 16:516-25.

Peplow PV, Chatterjee MP (2013) A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine* 62:1-21.

Pera MF, Gorman PA (1984) In vitro analysis of multistage epidermal carcinogenesis: development of indefinite renewal capacity and reduced growth factor requirements in colony forming keratinocytes precedes malignant transformation. *Carcinogenesis* 5:671-82.

Peura M, Bizik J, Salmenpera P, *et al.* (2009) Bone marrow mesenchymal stem cells undergo neogenesis and induce keratinocyte wound healing utilizing the HGF/c-Met/PI3K pathway. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 17:569-77.

Ponec M, Weerheim A, Kempenaar J, *et al.* (1997) The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *The Journal of investigative dermatology* 109:348-55.

Poumay Y, Coquette A (2006) Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Archives of Dermatological Research* 298:361-9.

Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, *et al.* (2004) A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res* 296:203-11.

Prunieras M, Regnier M, Woodley D (1983a) Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *The Journal of investigative dermatology* 81:28s-33s.

Prunieras M, Regnier M, Woodley D (1983b) METHODS FOR CULTIVATION OF KERATINOCYTES WITH AN AIR-LIQUID INTERFACE. *Journal of Investigative Dermatology* 81:S28-S33.

Rasmussen C, Thomas-Virnic C, Allen-Hoffmann BL (2013) Classical human epidermal keratinocyte cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 945:161-75.

Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-43.

Rheinwald JG, Green H (1977) Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 265:421-4.

Roguet R, Cohen C, Leclaire J, *et al.* (2000) Use of a standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics. *International journal of cosmetic science* 22:409-19.

Royack GA, Nguyen MP, Tong DC, *et al.* (2000) Response of human oral epithelial cells to oxidative damage and the effect of vitamin E. *Oral Oncology* 36:37-41.

Rozman B, Gasperlin M, Tinois-Tessoneaud E, *et al.* (2009) Simultaneous absorption of vitamins C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 72:69-75.

Schultz GS, Wysocki A (2009) Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 17:153-62.

Sivamani RK, Lam ST, Isseroff RR (2007a) Beta adrenergic receptors in Keratinocytes. *Dermatologic Clinics* 25:643-+.

Sivamani RK, Lam ST, Isseroff RR (2007b) Beta Adrenergic Receptors in Keratinocytes. *Dermatologic Clinics* 25:643-53.

Sridhar S, Venugopal JR, Ramakrishna S (2015) Improved regeneration potential of fibroblasts using ascorbic acid-blended nanofibrous scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A* 103:3431-40.

Stark HJ, Baur M, Breitzkreutz D, *et al.* (1999) Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 112:681-91.

Sun R, Celli A, Crumrine D, *et al.* (2015a) Lowered Humidity Produces Human Epidermal Equivalents with Enhanced Barrier Properties. *Tissue Engineering Part C-Methods* 21:15-22.

Sun R, Celli A, Crumrine D, *et al.* (2015b) Lowered humidity produces human epidermal equivalents with enhanced barrier properties. *Tissue engineering Part C, Methods* 21:15-22.

Takagi R, Yamato M, Murakami D, *et al.* (2011a) Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 5:e63-73.

Takagi R, Yamato M, Murakami D, *et al.* (2011b) Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5:E63-E73.

Terranova VP, Rohrbach DH, Martin GR (1980) Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 22:719-26.

Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, *et al.* (1991) In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Experimental cell research* 193:310-9.

Turksen K, Choi Y, Fuchs E (1991) Transforming growth factor alpha induces collagen degradation and cell migration in differentiating human epidermal raft cultures. *Cell Regul* 2:613-25.

van der Valk J, Brunner D, De Smet K, *et al.* (2010) Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24:1053-63.

Watt FM (1984) Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *The Journal of cell biology* 98:16-21.

Wong T, McGrath JA, Navsaria H (2007) The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology* 156:1149-55.

Woodley DT, Wynn KC, O'Keefe EJ (1990) Type IV collagen and fibronectin enhance human keratinocyte thymidine incorporation and spreading in the absence of soluble growth factors. *The Journal of investigative dermatology* 94:139-43.

Wu YJ, Parker LM, Binder NE, *et al.* (1982) The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and nonkeratinizing epithelia. *Cell* 31:693-703.

Archives of Dermatological Research

Plasma membrane cholesterol depletion combined to incubation with interleukin-4 reproduce major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model

–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	AODR-D-16-00196R1	
Full Title:	Plasma membrane cholesterol depletion combined to incubation with interleukin-4 reproduce major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model	
Article Type:	Concise Communications	
Keywords:	atopic dermatitis model; reconstructed human epidermis; cholesterol depletion; interleukin-4	
Corresponding Author:	Yves Pourmay, Ph.D. University of Namur (FUNDP) Namur, BELGIUM	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of Namur (FUNDP)	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Tatiana do Nascimento Pedrosa	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Tatiana do Nascimento Pedrosa Évelyne De Vuyst Abdallah Mound, Ph.D. Catherine Lambert de Rouvroit, Ph.D. Silvia Sauchi Maria-Engler, Ph.D. Yves Pourmay, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	FFAPESP (2015/23938-0) FNRS/FRFC (2.4.522.10F)	Mrs. Tatiana do Nascimento Pedrosa Prof. Yves Pourmay
Abstract:	Atopic dermatitis (AD) skin is characterized by over-expression of interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25. When in vitro plasma membrane cholesterol depletion (CD) preceded exposure to these interleukins, combination of both treatments was found to mimic hallmarks of AD, such as barrier weakening, histological alterations and typical signaling responses in a reconstructed human epidermis (RHE). However, the respective role of each IL and whether any of them was critical when combined with CD is unknown. Therefore this work aimed to distinguish RHE responses after CD and exposure to one of the three IL reported to mimic typical features of AD. IL-4 preceded by CD was found responsible for altered histology, as well as for barrier alterations, evidenced by electrical resistance and dye permeation measurements performed through IL-4-treated RHE. This combination further decreased loricrin (LOR) immunoreactivity, whereas mainly IL-25, combined to CD, was able to downregulate filaggrin (FLG) mRNA expression. Carbonic anhydrase II (CA2) and hyaluronan synthase 3 (HAS3), two other markers up-regulated in AD, were also induced when CD was followed by IL-4, whilst expression of neural epidermal growth factor-like 2 (NELL2) was up-regulated by paired IL-4 and IL-13. In conclusion, multiple features of AD were found in this in vitro model mainly when treatment of RHE by IL-4 was conducted after preliminary CD from the tissue.	
Response to Reviewers:	Dear Editor,	

Plasma membrane cholesterol depletion combined to incubation with interleukin-4 reproduce major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model

Tatiana do Nascimento Pedrosa^{1,2}, Evelyne De Vuyst¹, Abdallah Mound¹, Catherine Lambert de Rouvroit¹, Silvy Stuchi Maria-Engler² and Yves Poumay^{*1}

¹ Research Unit for Molecular Physiology (URPhyM)-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium

² Skin Biology Laboratory, Clinical Chemistry & Toxicology Department, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

***Corresponding Author:**

Correspondence: Professor Yves Poumay,
URPhyM-NARILIS, University of Namur,
61, rue de Bruxelles,
B-5000 Namur, Belgium.

E-mail: yves.poumay@unamur.be

Phone: +32 81 72 42 57

Abstract

Atopic dermatitis (AD) skin is characterized by over-expression of interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25. When *in vitro* plasma membrane cholesterol depletion (CD) preceded exposure to these interleukins, combination of both treatments was found to mimic hallmarks of AD, such as barrier weakening, histological alterations and typical signaling responses in a reconstructed human epidermis (RHE). However, the respective role of each IL and whether any of them is critical when combined with CD was unknown. Therefore this work aimed to distinguish RHE responses after CD and exposure to one of the three IL reported to mimic typical features of AD. IL-4 preceded by CD was found responsible for altered histology, as well as for barrier alterations, evidenced by electrical resistance and dye permeation measurements performed through IL-4-treated RHE. This combination further decreased loricrin (LOR) immunoreactivity, whereas mainly IL-25, combined to CD, was able to downregulate filaggrin (FLG) mRNA expression. Carbonic anhydrase II (CA2) and hyaluronan synthase 3 (HAS3), two other markers up-regulated in AD, were also induced when CD was followed by IL-4, whilst expression of neural epidermal growth factor-like 2 (NELL2) was up-regulated by paired IL-4 and IL-13. In conclusion, multiple features of AD were found in this *in vitro* model mainly when treatment of RHE by IL-4 was conducted after preliminary CD from the tissue.

Keywords: reconstructed human epidermis, atopic dermatitis, interleukins, epidermal barrier and methyl- β -cyclodextrin.

Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin condition linked to Th2 cell type immune response [4,13,22]. Over-expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-4 and IL-13 (Th2-cytokines) are indeed observed in AD patients [10,13,23,27,30,32], but other studies demonstrate that IL-25 produced by dendritic cells may also be involved, both to induce Th2 response and to inhibit filaggrin synthesis, directly affecting function of skin barrier in AD patients [13].

Recently, our laboratory has shown that plasma membrane cholesterol depletion (CD) using methyl-beta-cyclodextrin (M β CD) in reconstructed human epidermis (RHE) followed by exposure to IL-4, IL-13 and IL-25, can mimic hallmarks of AD. This includes barrier weakening, as well as typical histological and signaling alterations [7]. However, in those trials for modelling epidermal AD lesions *in vitro*, the respective role of each IL and the consequences due to combination of CD with each of them remained incompletely understood. Thus, this work aimed to understand responses given to CD by RHE exposed subsequently to single or combined cytokines in order to set up an AD-like model.

Material & Methods

Cell culture and production of RHE

Normal adult human skin was obtained from abdominoplasties (Dr. B. Bienfait, Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Belgium) and keratinocytes were cultured as described [5,8,26]. This study was conducted according to the Declaration of Helsinki Principles and approved by the Ethics Committees. To produce RHE, keratinocytes were cultured at high density submerged, with Epilife® medium (Cascade Biologics, Paisley, UK), inside polycarbonate porous inserts (0.4 μ m diameter pore size; Merck-Millipore, Overijse, Belgium) before being raised to the air-liquid interface the next day. Medium was then changed every two days. From the 11th day, RHE were pretreated or not for 2h with 7.5 mM methyl-beta-cyclodextrin (M β CD) (Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium) solubilized in culture medium, then incubated for 48h with 50 ng/mL IL-4 or IL-13, or 20 ng/mL IL-25 (Peprtech, London, UK) alone or as a mixture composed of the three cytokines (IL mix), as previously described [7].

Morphology and indirect immunofluorescence microscopy

Paraffin sections of RHE (6 μ m) were stained with hemalun and erythrosine (H&E) for morphological analysis. For carbonic anhydrase II (CA2) and loricrin (LOR), immunofluorescence detection was realized using antibodies from Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium diluted 1:500 for CA2 and from Abcam, Cambridge, UK diluted 1:100 for LOR. Antigen retrieval was performed in pH 6.0 citrate buffer for 20 min at 100°C. . Tissue samples were incubated for one hour with Alexa 488 conjugated anti-rabbit IgG (Life technologies, Ledeborg, Belgium). Secondary antibodies were diluted 1:100 and images obtained using epifluorescence microscopy. Negative controls were prepared using secondary antibodies (data not shown). For CA2, intensity of the detection signal was measured using the image analysis software provided with the Olympus BX63 microscope (Olympus, Berchem, Belgium).

Trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements and permeability to Lucifer yellow

TEER measurements through RHE were performed using Millicell-Electrical Resistance System (Merck-Millipore, Overijse, Belgium). Analysis of the RHE permeability to Lucifer yellow (LY) fluorescent dye (Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium) was performed using 150 µl of the fluorescent dye at 1 mM (diluted in PBS) and applied on top of the RHE for 6 hours at 37°C. Medium was then collected and fluorescence was measured (λ_{ex} : 485 nm; λ_{em} : 535 nm).

Analysis of mRNA expression by RT-qPCR

Total RNA was extracted from RHE using NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and reverse-transcribed into cDNA using the SuperScript II RNase H-reverse transcriptase kit (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). The amplification was performed using the FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Basel, Switzerland) in the Light Cycler® 96 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Genes were normalized to the reference gene RPLP0 [21], whereas primers (Eurogentec, Liège, Belgium) were used at a concentration of 300nM in accordance with previously described sequences and reaction conditions [7]. Sequences of primers used to perform the RT-qPCR can be found in table S1. Data were analyzed using the $\Delta\Delta C_q$ quantitative method and 95% confidence intervals were calculated after two-way analysis of variance [6].

RESULTS

Cholesterol depletion followed by exposure to IL-4 in RHE induces the strongest morphological alterations and weakening of barrier function in this model

In order to appreciate which role individual components used in a recent *in vitro* model of AD play in mimicking the disease, RHE were first treated or not for 2h with M β CD to deplete cholesterol from keratinocytes plasma membrane. CD has been assessed in RHE during previous studies by measurements of cholesterol concentration and/or filipin staining of frozen sections [6,7]. After the CD, RHE were incubated 48h with IL-4, IL-13, IL-25, or with a mixture of these interleukins. Figure 1A illustrates that histology of RHE is mostly affected by combination of M β CD and IL-4 incubation, producing alterations almost similar to those seen after incubation with mixed IL. A strong influence is also observed when CD followed by incubation of the RHE with IL-13 is performed. Conversely, incubation of RHE with IL-25 does not result into noticeable histological alterations, both following CD or not. It appears as if incubation with IL-4 reduces the *stratum corneum*'s thickness. Furthermore, when M β CD is combined with IL-4 or IL-13, the granular layer is strongly altered and nearly absent.

Alterations in barrier function can be evaluated by TEER measurements (Figure 1B). TEER mainly decreases when RHE are treated with IL-4. In addition, significant contributions of IL-13 and IL-25 were also observed, but without any additive reductions (Figure 1B). Reductions in TEER were found independent of eventual previous challenge of keratinocytes by CD. Conversely, studies of permeability of RHE to the fluorescent LY dye (Figure 1C) indicate that incubation with IL-4 has most prominent consequences, which are emphasized by the combination of CD with the IL MIX, as was previously reported [7].

Cholesterol depletion enhances overexpression of carbonic anhydrase II (CA2) in RHE subsequently treated with IL-4 or IL-13

CA2 expression was analyzed in the treated RHE using immunofluorescent labelling (Figure 2 + quantification in suppl. figure S1), as well as by RT-qPCR in order to assess CA2 relative mRNA expression (Figure 3D). CA2 mainly appears overexpressed when RHE were incubated with IL-4, especially after CD, or with IL-13, but weak increase after incubation with IL-25 is also suggested by the immunofluorescent data (Figure 2). When looking at the transcript relative levels, both IL-4 and IL-13 indicate significant induction of CA2 gene expression. This induction was even further increased if preceded by plasma membrane CD (Figure 3D).

Cholesterol depletion reduces loricrin (LOR) expression in RHE treated with IL-4

Results for LOR expression indicate no significant variation at the mRNA level but once CD is followed by treatment of RHE with IL-4, strong and reproducible loss in LOR expression at the protein level can be observed through immunofluorescent labelling in this model (Figure 2).

Cholesterol depletion in RHE, as well as incubation with IL-4 regulates critical gene expression

FLG is an epidermal differentiation gene whose expression is usually downregulated in lesional AD, in a quite similar way to LOR [17,25,31]. After CD and treatment with interleukins for 48 h, FLG-1 and FLG-2 mRNA expression levels are significantly reduced when the treatment is followed by exposure to IL-25 (fig.3A and 3B). Whereas CA2 mRNA expression is mostly increased by IL-4 after CD, neural epidermal growth factor-like 2 (NELL2) mRNA expression is increased by incubation with IL-4 or IL-13, independently of CD. No additive effect is observed though when both IL are present in the mixed IL treatment (fig.3D and 3E).

Data illustrated on Figure 3F indicate that the increase in hyaluronic acid (HA) synthase 3 (HAS3) relative mRNA expression mainly occurs due the combined CD and incubation with IL-4, although the IL MIX alone produces a significant induction.

Finally in the conditions studied herein, mRNA expression levels for thymic stromal lymphopoietin (TSLP) or heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) were not significantly affected unlike reported after shorter incubations periods following M β CD incubation [7].

Discussion and Conclusion

It was previously shown that CD in keratinocytes within RHE [7] and in combination with exposure to IL-4, IL-13 and IL-25 was adding features typical of AD to an *in vitro* epidermal model of this disease [7]. The present study was devoted at identifying individual roles of IL in creating such features in combination with CD.

Th2-related cytokines alter morphology in RHE and prior incubation of the RHE with M β CD further enhances these alterations [7]. Epidermal spongiosis (one of the main characteristics of eczematous lesions) can be induced by IL-4 and IL-13 in skin equivalents [3,14]. Spongiosis is further increased if previous CD from keratinocytes embedded in RHE is performed [7]. Here, we demonstrate that CD contributes with IL-4 to create spongiosis in RHE, while simultaneously decreasing thickness of *stratum corneum* and inducing hypogranulosis, two other epidermal hallmarks of AD. Accordingly, by studying the functionality of the epidermal barrier, we demonstrate that IL-4 produces the greatest alterations, together on TEER of the tissue and on its permeability to LY.

In addition, IL-13 combined to CD, or IL-25 alone, also significantly reduce TEER. According to studies of LY permeation, maximal alterations are observed in barrier function when IL MIX was applied after CD. This indicates potential additive effect of the IL mix when plasma membrane lipid microdomains of keratinocytes were previously disrupted. In the literature, IL-4 and IL-13, but not IL-25, have been shown responsible for barrier disruption in human airway epithelium, with maximal effect attributed to IL-4 [28].

LOR localizes inside granular keratinocytes in normal epidermis, but decreased signals are observed in lesional and non-lesional AD skin, as well as in RHE exposed to IL-4 and IL-13 [17]. Immunofluorescent detection of LOR in this study demonstrated important decrease only when CD was performed before incubating RHE with IL-4 (Figure 2 and [7]). However, this loss in protein expression is not concomitant with a decrease at the mRNA level (Figure 3A), suggesting either that an effect on transcript level should be analyzed earlier than after 48 hours or that the reduced protein level of LOR might result from translational or post-translational regulation.

A lack of FLG expression is connected with disturbances in epidermal differentiation, alterations in barrier lipid composition and organization, reduction in natural moisturizing factors and increase in epidermal permeability [11]. Several studies have already illustrated reduced filaggrin expression as a consequence of keratinocyte exposure to Th2-cytokines [7,12,13,16,29], acting on both FLG-1 and -2 expression levels. Current data suggest that these cytokines require previous CD in order to significantly reduce FLG-1 and FLG-2 mRNA levels. However, when these cytokines were used individually, no significant decrease in FLG-1 or FLG-2 expression levels could be found, unlike the observations performed after exposure to IL MIX (Figure 3B and C).

Gene expression for CA2 and NELL2 is upregulated in AD, although no pathophysiological role has been assigned yet [14,15], and both genes are upregulated in this model [7]. However, current data suggest that CD prior to incubation of RHE with IL-4 most strongly concur to upregulate CA2 gene expression. Regarding regulation of NELL2, Th2-cytokines (IL-4 and IL-13) exhibit potential roles but without any additive effect when combined, or after CD.

HA synthesis is increased in inflammatory skin diseases and previous studies have shown that HAS3, an enzyme responsible for epidermal HA synthesis, is upregulated in AD lesional skin, as well as in culture when CD is combined with exposure of RHE to IL MIX [7,19,24]. Skin of AD patients also expresses HB-EGF which in turn can modulate HAS1 and HAS3 gene expression [19]. In addition, studies performed on RHE revealed that HB-EGF dose-dependently raises HAS3 expression [19]. In this study, no significant increase in HB-EGF expression was observed, whilst HAS3 expression was mainly induced by IL-4 after CD. Expression levels for HB-EGF were reported as increased in keratinocytes solely during the first hours that follow CD, but no more 48h later [6,9,20].

Absence of variation in TSLP gene expression is likely a similar phenomenon. Indeed, whereas CD significantly increases TSLP expression levels for a few hours [7], it has been reported that IL-4 and IL-13 cannot stimulate TSLP expression by themselves, but rather require combined exposure to TNF α or IL-1 α in order to reach significant induction [2].

Finally, cholesterol controls cell-signaling in keratinocytes [18,20]. Current data and previous works [6,7,19,20] concur to assess that lipid microdomains influence epidermal-signaling, thereby contributing with IL-4 to alter the phenotype of keratinocytes, potentially in all epidermal layers. Both IL-4 and IL-13 act on keratinocytes via the IL-4R α /IL-13R α 1 receptor [1]. Furthermore, this receptor is found upregulated in chronic inflammatory diseases like AD and psoriasis [33]. Interestingly, IL-13R α 2, IL-13R α 1, IL-4R α and IL17RA

(subunit of the IL25 receptor) receptors are all upregulated in keratinocytes after CD [20], indicating that cholesterol may also regulate cell signaling through these receptors, perhaps due to localization inside lipid microdomains.

In conclusion, IL-4 and IL-13 induce rather similar response profiles by RHE in most tested conditions, but their combination does not produce stronger effects in this model. This may be explained by signaling through common receptors. A significant contribution of IL-25 after CD to reduce FLG expression was reported here with simultaneous decreased TEER. However, major consequences mimicking hallmarks of AD in this RHE model mainly resulted from incubation of epidermal keratinocytes with IL-4 after CD.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the technical help provided by B. Balau, V. De Glas and D. Van Vlaender. Special thanks are addressed to Dr B. Bienfait (Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Belgium) for providing skin samples. Financial support was provided by FRFC 2.4.522.10F grant to YP and FAPESP (Grant # 2015/23938-0) to TDNP.

Competing interest

The authors declare no competing interest.

References

1. Akaiwa M, Yu B, Umeshita-Suyama R, Terada N, Suto H, Koga T, Arima K, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Furue M, Hamasaki N, Ohshima K, Izuhara K (2001) Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine* 13 (2):75-84
2. Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC, Marloie-Provost MA, Volpe E, Sastre X, Soumelis V (2007) Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* 178 (6):3373-3377
3. Danso MO, van Drongelen V, Mulder A, van Esch J, Scott H, van Smeden J, El Ghalbzouri A, Bouwstra JA (2014) TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J Invest Dermatol* 134 (7):1941-1950
4. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127 (3):773-786 e771-777
5. De Vuyst E, Charlier C, Giltair S, De Glas V, de Rouvroit CL, Poumay Y (2014) Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods Mol Biol* 1195:191-201. doi:10.1007/7651_2013_40
6. De Vuyst E, Giltair S, Lambert de Rouvroit C, Chretien A, Salmon M, Poumay Y (2015) The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures. *Arch Dermatol Res* 307 (4):309-318

7. De Vuyst E, Giltaire S, Lambert de Rouvroit C, Malaisse J, Mound A, Bourtembourg M, Nikkels AF, Chretien A, Salmon M, Poumay Y (2016) M β CD concurs with IL-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol*. doi:10.1111/exd.13113
8. Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, Minner F, de Rouvroit CL, Poumay Y (2012) Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol* 21 (11):871-875
9. Giltaire S, Lambert S, Poumay Y (2011) HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways. *J Cell Physiol* 226 (6):1651-1659
10. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY (1994) Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 94 (2):870-876
11. Honzke S, Wallmeyer L, Ostrowski A, Radbruch M, Mundhenk L, Schafer-Korting M, Hedtrich S (2016) Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and ss-Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. *J Invest Dermatol* 136 (3):631-639
12. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DY (2009) Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124 (3 Suppl 2):R7-R12
13. Hvid M, Vestergaard C, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Deleuran M (2011) IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? *J Invest Dermatol* 131 (1):150-157
14. Kamsteeg M, Bergers M, de Boer R, Zeeuwen PLJM, Hato SV, Schalkwijk J, Tjabringa GS (2011) Type 2 Helper T-Cell Cytokines Induce Morphologic and Molecular Characteristics of Atopic Dermatitis in Human Skin Equivalent. *Am J Pathol* 178 (5):2091-2099
15. Kamsteeg M, Zeeuwen PL, de Jongh GJ, Rodijk-Olthuis D, Zeeuwen-Franssen ME, van Erp PE, Schalkwijk J (2007) Increased expression of carbonic anhydrase II (CA II) in lesional skin of atopic dermatitis: regulation by Th2 cytokines. *J Invest Dermatol* 127 (7):1786-1789
16. Kim BE, Bin L, Ye YM, Ramamoorthy P, Leung DY (2013) IL-25 enhances HSV-1 replication by inhibiting filaggrin expression, and acts synergistically with Th2 cytokines to enhance HSV-1 replication. *J Invest Dermatol* 133 (12):2678-2685
17. Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD (2008) Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol* 126 (3):332-337
18. Leung DYM, Bieber T (2003) Atopic dermatitis. *The Lancet* 361 (9352):151-160
19. Malaisse J, Bourguignon V, De Vuyst E, Lambert de Rouvroit C, Nikkels AF, Flamion B, Poumay Y (2014) Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol* 134 (8):2174-2182
20. Mathay C, Pierre M, Pittelkow MR, Depiereux E, Nikkels AF, Colige A, Poumay Y (2011) Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Dermatol* 131 (1):46-58
21. Minner F, Poumay Y (2009) Candidate housekeeping genes require evaluation before their selection for studies of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 129 (3):770-773

22. Noda S, Suarez-Farinas M, Ungar B, Kim SJ, de Guzman Strong C, Xu H, Peng X, Estrada YD, Nakajima S, Honda T, Shin JU, Lee H, Krueger JG, Lee KH, Kabashima K, Guttman-Yassky E (2015) The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *J Allergy Clin Immunol* 136 (5):1254-1264
23. Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB, Leung DY (2003) Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112 (6):1195-1202
24. Ohtani T, Memezawa A, Okuyama R, Sayo T, Sugiyama Y, Inoue S, Aiba S (2009) Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Dermatol* 129 (6):1412-1420
25. Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Mechin MC, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt AM, Serre G, Paul C, Simon M (2013) Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131 (4):1094-1102
26. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Herin M, Coquette A (2004) A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res* 296 (5):203-211
27. Rouaud-Tinguely P, Boudier D, Marchand L, Barruche V, Bordes S, Coppin H, Roth MP, Closs B (2015) From the morphological to the transcriptomic characterization of a compromised three-dimensional in vitro model mimicking atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 173 (4):1006-1014
28. Saatian B, Rezaee F, Desando S, Emo J, Chapman T, Knowlden S, Georas SN (2013) Interleukin-4 and interleukin-13 cause barrier dysfunction in human airway epithelial cells. *Tissue Barriers* 1 (2):e24333
29. Seltsmann J, Roesner LM, von Hesler FW, Wittmann M, Werfel T (2015) IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of filaggrin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 135 (6):1659-1661 e1654
30. Tazawa T, Sugiura H, Sugiura Y, Uehara M (2004) Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 295 (11):459-464
31. Thyssen JP, Kezic S (2014) Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 134 (4):792-799
32. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, Hippe A, Corrigan CJ, Dong C, Homey B, Yao Z, Ying S, Huston DP, Liu YJ (2007) IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *The Journal of experimental medicine* 204 (8):1837-1847
33. Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H (2003) Up-regulation of interleukin-13 receptor α 1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 33 (1):31-40

Figure legends

Fig.1. Morphological and barrier function alterations after cholesterol depletion and use of Th2-related cytokines. Reconstructed human epidermis (RHE) were pretreated or not for 2 hours with M β CD (7.5 mM), then cultured for 48 hours with IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), alone or in a mixture of all cytokines (IL MIX). (A) Histological sections of RHE are representative of three independent experiments using keratinocytes from three different patients to prepare the RHE. Scale bar = 20 μ m. (B) Trans-epidermal electrical resistance (TEER) measurements performed on RHE (n=3). (C) Permeability to Lucifer yellow fluorescent dye. (B) and (C) Three independent experiments were performed. Data represent mean $\pm$ SD. Two-way ANOVA were performed, followed by Bonferroni tests. *p < 0.05, ** p < 0.01 and ***p < 0.001. Each averaged-measurement is compared to the one measured in control conditions (-M β CD) when the statistical significance is indicated between parentheses, otherwise measurements are compared to the linked condition.

Fig.2. Immunostaining of AD markers in histological sections of treated RHE. Reconstructed human epidermis (RHE) were pretreated or not for 2 hours with M β CD (7.5mM), then cultured for 48 hours with IL-4 (50 ng/mL), IL-13 (50 ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), alone or in a mixture of all cytokines (IL MIX), then analyzed by immunofluorescence. Left panel: immunofluorescent labelling of carbonic anhydrase II (CA2). Scale bar = 50 μ m. Right panel: immunofluorescence analysis of loricrin (LOR). Scale bar = 100 μ m. Nuclei were stained in blue (Hoechst 33258). Images are representative of three independent experiments using keratinocytes from three different donors.

Fig.3. Transcriptional study of genes commonly regulated in AD. mRNA expression was evaluated by RT-qPCR in RHE treated or not for 2 hours with M β CD (7.5 mM), then cultured for 48 hours with IL-4 (50ng/mL), IL-13 (50ng/mL) and IL-25 (20 ng/mL), alone or in a mixture of all cytokines (IL MIX). (A) Loricrin (LOR); (B) Filaggrin-1 (FLG-1); (C) Filaggrin-2 (FLG-2); (D) Carbonic anhydrase II (CA2); (E) Neural epidermal growth factor-like 2 (NELL2); (F) Hyaluronan synthase 3 (HAS3); (G) thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and (H) heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) mRNA relative expression levels. Three independent experiments were performed. Error bars represent 95% confidence intervals. Two-way ANOVA analysis was performed, followed by Bonferroni tests. *p < 0.05, ** p < 0.01 and ***p < 0.001. Each averaged-measurement is compared to the one measured in control conditions (-M β CD) when the statistical significance is indicated between parentheses, otherwise measurements are compared to the linked condition.

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

Plasma membrane cholesterol depletion combined with interleukin-4 reproduce major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model

Tatiana do Nascimento Pedrosa^{1,2}, Evelyne De Vuyst¹, Abdallah Mound¹, Catherine Lambert de Rouvroit¹, Silvy Stuchi Maria-Engler² and Yves Poumay^{*1}

¹ Research Unit for Molecular Physiology (URPhyM)-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium

² Skin Biology Laboratory, Clinical Chemistry & Toxicology Department, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
RPLP0	ATCAACGGGTACAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
FLG	GGGCACTGAAAGGCAAAAAG	CACCATAATCATAATCTGCACTACCA
LOR	TCATGATGCTACCCGAGGTTTG	CAGAACTAGATGCAGCCGGAGA
HAS3	GCCCTCGGCGATTCTG	TGGATCCAGCACAGTGTGAGA
CAII	AACAATGGTCATGCTTTCAACG	TGTCCATCAAGTGAACCCCAG
NELL2	TAAGGGTATAATGCAAGATGTCCAATT	AGATCTGGGCACTGAGCAATAAA
TSLP	CGCGTCGCTCGCCAAAGAAA	TGAAGCGACGCCACAATCCTTG
HB-EGF	TGGCCCTCCACTCCTCATC	GGGTACAGAACCATCCTAGC
FLG2	ACCAGGTTCACTTAAACTTGCA	ATGACATCCACTGTGTCTGGATC

TABLE S1: Oligonucleotides used to perform the RT-qPCR

Figure S1: Measurement of CA2 labelling intensity. Reconstructed human epidermis were pretreated (+MβCD) or not (-MβCD) for 2 hours with MβCD, then cultured for 48 hours with IL-4, IL-13 and IL-25, alone or in a mixture of all cytokines (IL MIX), then analyzed by immunofluorescence for carbonic anhydrase II (CA2). Experiment is representative of three independent experiments using keratinocytes from three different donors. Negative controls (NegCTRL) were performed using secondary antibodies. Intensity of the detection signal was measured using the image analysis software provided with the Olympus BX63 microscope. Intensity of pixels was divided by the area (μm²) for the three experiments. Means and SD were then calculated.

09/10/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 8722705/1 - Tatiana do Nascimento Pedrosa

Email:	tatianapedrosa@usp.br
Data de Nascimento:	13/10/1987
Cédula de Identidade:	RG - 1880599-0 - AM
Local de Nascimento:	
Nacionalidade:	
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal do Amazonas - Amazonas - Brasil - 2011
Mestrado:	Mestra em Ciências Farmacêuticas (1) - Bioatividade e Desenvolvimento de Insumos e Produtos Farmacêuticos - Universidade Federal do Amazonas - Amazonas - Brasil - 2013
Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	24/06/2013
Início da Contagem de Prazo:	24/06/2013
Data Limite para o Depósito:	26/06/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 24/06/2013 até o presente. Email: silvy@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Silvia Berlanga de Moraes Barros - 08/04/2015 até o presente. Email: sbarros@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 24/06/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 19/08/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 24/06/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 09/10/2016 16:04:19

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

09/10/2016

Observações:	Nome da Disciplina	Documento sem validade oficial	Cred. Freq. Conc. Exc. Situação
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese

FICHA DO ALUNO

9136 - 8722705/1 - Tatiana do Nascimento Pedrosa

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5753-3/1	Processos de Invasão Celular	05/08/2013	15/09/2013	90	6	80	A	N	Concluída
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	87	A	N	Concluída
BMI5863-7/2	Seminário Didático-Científico em Imunologia II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	15/08/2013	27/11/2013	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5800-1/2	Patentes em Fármaco e Medicamentos	20/08/2013	21/10/2013	45	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5733-3/2	Ciências Farmacêuticas na Educação em Saúde	07/10/2013	20/10/2013	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5734-2/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	09/12/2013	15/12/2013	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5792-3/1	Tópicos em Análises Clínicas III	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBA5728-3/9	Aprimoramento Didático	25/03/2014	21/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5766-4/1	Tópicos em Análises Clínicas IV	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.225, de 05.10.2010..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 09/10/2016 16:04:19

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

09/10/2016

9136 - 8722705/1	Comissão julgadora da tese de doutorado:			
	NUSP	Nome	Vínculo	Função
	Comissão julgadora da tese de doutorado:			
	NUSP	Nome	Vínculo	Função
	3368462	Silvia Stuchi Maria Engler	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 09/10/2016 16:04:19

Tatiana do Nascimento Pedrosa

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4326496721677677>
- Última atualização do currículo em 13/10/2016

Atualmente é aluna de Doutorado em Farmácia na USP, onde desenvolve modelos de pele e epiderme humana reconstruídas (RHE) in vitro visando principalmente o uso como alternativas à experimentação animal. Realizou estágio de pesquisa no exterior na Universidade de Namur-Bélgica, onde desenvolveu, junto a equipe do Prof. Poumay, um modelo de dermatite atópica-RHE in vitro. Atua desenvolvendo modelos de pele pigmentada, pele/epiderme para ensaios de irritação, corrosão, sensibilização e estudos dos efeitos da radiação UV. É mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) onde atuou com a avaliação de atividade antioxidante, avaliação de segurança e atividade despigmentante e rejuvenescedora de diferentes extratos e óleos essenciais de plantas da amazônia. Possui experiência na área de segurança e atividade biológica de medicamentos e cosméticos (testes de citotoxicidade, atividade antioxidante, atividade despigmentante, enzimas relacionadas ao envelhecimento cutâneo, ensaios para avaliação de segurança de produtos cosméticos). **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Tatiana do Nascimento Pedrosa

Nome em citações bibliográficas

PEDROSA, T. N.; Tatiana do Nascimento Pedrosa; PEDROSA, Tatiana do Nascimento; PEDROSA, TATIANA; Tatiana do N. Pedrosa

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Avenida Professor Lineu Prestes, 580, FCF, bl. 17, Sl. 114

Butantã

05508000 - São Paulo, SP – Brasil

Telefone: (11) 30913632

URL da Homepage: <https://br.linkedin.com/in/tatiana-pedrosa-b4a62853>

Formação acadêmica/titulação

2013

Doutorado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

com **período sanduíche** em Université de Namur (Orientador: Dr. Yves Poumay).

Título: Desenvolvimento de Epiderme Humana Reconstruída (RHE) como plataforma de testes in vitro para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunossupressão,

Orientador: Silvy Stuchi Maria-Engler.

Coorientador: Sílvia Berlanga de Moraes Barros.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

Palavras-chave: Epiderme e pele humana reconstruída; Dermatite atópica; Avaliação de segurança; Cosméticos; Irritação; Sensibilização.

2011 - 2013

Mestrado em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 3).

Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.

com **período sanduíche** em Universidade de São Paulo (Orientador: Silvy Stuch Maria-Engler).

Título: Avaliação do potencial dos derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e o envelhecimento cutâneo, Ano de Obtenção: 2013.

Orientador: Marne Carvalho de Vasconcellos.

Coorientador: Emerson Silva Lima.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, FAPAM, Brasil.

Grande área: Ciências Biológicas

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

2005 - 2010

Graduação em Farmácia.

Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.

Formação Complementar

2015 - 2015

Gestão de Projetos - Project Management (PMI). (Carga horária: 40h).]

Faculdade de Informática e Administração Paulista, FIAP, Brasil.

2010 - 2010

Farmacologia, curso de inverno. (Carga horária: 50h).

Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil.

2006 - 2006

Formação de Multiplicadores - A Doação de Sangue.. (Carga horária: 4h).

Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, FHEMOAM, Brasil, FHEMOAM, Brasil.

2005 - 2005

Preparo e Administração de Medicamentos Injetáveis. (Carga horária: 4h).

Conselho Regional de Farmácia dos Estados do Amazonas e Roraima, CRF AM/RR,, CRF-AM/RR, Brasil.

2005 - 2005

Aspectos Clínicos, Imunológicos da Hepatite Viral. (Carga horária: 4h).

Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.

2005 - 2005

Parasitologia Básica. (Carga horária: 6h).

Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - Manaus/AM, SBPC - AM, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante de Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2013 - 2013

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Desenvolvimento Tecnológico Industrial CNPq-2, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - 2013

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna de Mestrado - Bolsista FAPEAM, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2005 - 2010

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Aluna da Graduação

Atividades

08/2008 - 12/2009

Extensão universitária , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Atividade de extensão realizada

PIBEX - AÇÃO SAÚDE: A UNIVERSIDADE LEVANDO INFORMAÇÃO À RÁDIO COMUNITÁRIA (Bolsista).

07/2007 - 10/2009

Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Cargo ou função

Representante Discente no Colegiado de Curso.

09/2007 - 03/2008

Ensino, Farmácia, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

Monitora da Disciplina Farmacognosia (Bolsista)

09/2005 - 09/2007

Outras atividades técnico-científicas , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Atividade realizada

Programa de Educação Tutorial - PET-Farmácia UFAM (Bolsista).

04/2007 - 08/2007

Ensino, Farmácia, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

Monitora da Disciplina Farmacobotânica (Colaboradora)

09/2005 - 03/2006

Extensão universitária , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Atividade de extensão realizada

Palestras Informativas sobre cuidados de Primeiros Socorros para Estudantes do Ensino Fundamental.

Hospital Universitário Getúlio Vargas, HUGV, Brasil.

Vínculo institucional**2010 - 2010**

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Bolsista de Nível Superior, Carga horária: 30

Atividades**01/2010 - 12/2010**

Estágios , Setor de Farmácia, .

Estágio realizado

Atividades realizadas: Dispensação de Medicamentos e Produtos para a Saúde; Manipulação supervisionada de medicamentos líquidos orais e cremes de uso tópico; Auxílio na preparação de Nutrição Parenteral, Elaboração de POPs e treinamentos..

Secretaria Municipal de Saude de Manaus (AM), SEMSA, Brasil.

Vínculo institucional**2010 - 2010**

Vínculo: Bolsista de Nivel Superior, Enquadramento Funcional: Estagiario de Farmacia, Carga horária: 30

Atividades**03/2010 - 05/2010**

Estágios , Farmacia Gratuita, .

Estágio realizado

Atividades Desenvolvidas: Dispensação de medicamentos da atenção básica, Dispensação de medicamentos sujeitos a controle especial (Port. 344/98), Orientação para o Uso Racional de Medicamentos, Colaboração na elaboração de informes técnicos..

Projetos de pesquisa

2013 - Atual

Rede Nacional de Métodos Alternativos RENAMA Desenvolvimento de plataforma de epiderme equivalente para avaliação de segurança e eficácia pré-clínica de substâncias químicas

Descrição: Ao contrário da forte tendência mundial para o desenvolvimento de testes in vitro que supram o uso de animais em ensaios de avaliação de segurança, esta prática ainda é inexistente no Brasil. Apesar disso, essa prática deverá ser implementada rapidamente em nosso país para que atenda aos conceitos humanitários internacionais agregando valor ao produto de exportação das indústrias cosmética e farmacêutica brasileiras. Para tanto, faz-se necessária uma sistematização metodológica visando gerar uma plataforma de testes em epiderme equivalente, que validada, atenda as demandas das indústrias cosméticas e farmacêuticas, entre outras. A Diretiva Européia de 1986 induziu a discussão mundial de redução de testes em animais e a 7ª emenda desta Diretiva, publicada em 2004, determinou a transferência dos ensaios para a avaliação do risco para sistemas in vitro, e indo além, investiu em tecnologias alternativas. Diferentes abordagens foram desenvolvidas para suprir essa necessidade como, por exemplo, a geração de equivalentes de epiderme, sendo considerada a mais promissora e extensamente investigada. Dois equivalentes de epiderme (EpiDerm - MATTEK and EPISKINTM LÓREAL) comercialmente disponíveis foram validados pelo ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) e outros modelos de epiderme reconstruída estão sendo desenvolvidos em diferentes laboratórios de pesquisa no mundo, incluindo nosso laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Estes dois modelos são recomendados no Guia 431 que avalia in vitro a corrosão da pele. Embora o guia mencione que os experimentos podem ser realizados com peles reconstruídas nos laboratórios onde estes testes serão realizados, o desenvolvimento de um equivalente de epiderme na forma de Kit contribuirá para uma avaliação padronizada. Nosso laboratório vem seguindo a tendência mundial quanto ao desenvolvimento de testes in vitro para avaliação do risco da exposição da pele a substâncias quím..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Doutorado: (3) .

Integrantes: Tatiana do Nascimento Pedrosa - Integrante / Silvy Stuchi Maria-Engler - Coordenador / Enrique Boccardo - Integrante / Manoela Tiago - Integrante / Silvia Berlanga de Moraes Barros - Integrante / Silvana Sandri - Integrante / Paula Pennacchi - Integrante.

2012 - Atual

PROSPECÇÃO DE BIOATIVOS E DESENVOLVIMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS E COSMÉTICAS: EXPLORANDO A BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA

Descrição: Projeto Aprovado junto a FAPEAM no âmbito do Edital PRONEM. A biodiversidade amazônica é rica em recursos naturais ainda pouco explorados, principalmente do ponto de vista biotecnológico. Dentre as diversas opções biotecnológicas possíveis, a formulação de produtos farmacêuticos ou cosméticos, contendo como princípios ativos, produtos da biodiversidade amazônica parece ser uma das possibilidades mais viáveis para aproveitamento desses produtos. Essa afirmação se justifica pela grande demanda do mercado por este tipo de produto. Por exemplo, produtos naturais como óleos e extratos já vem sendo utilizados pelas indústrias de cosméticos no Brasil com sucesso, por exemplo na linha de dermocosméticos, shampoos e sabonetes. Pelas suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e de inibição em sistemas enzimáticos, os derivados de plantas podem ser incorporados com sucesso neste tipo de produtos. O objetivo do projeto em questão é realizar um estudo com bioativos, sejam extratos, frações ou substâncias isoladas a partir de plantas da Amazônia visando a aplicação em formulações dermocosméticas e produtos farmacêuticos na forma plástica (cremes, pomadas). Inicialmente, serão escolhidos pelo menos 200 bioativos. Estes bioativos serão avaliados quanto a inibição em enzimas-chave em processos ligados ao envelhecimento celular e inflamação. Em seguida serão realizados testes de citotoxicidade em células humanas. Os bioativos com efeito significativo de inibição nos modelos enzimáticos também serão submetidos a estudos de confirmação da atividade em modelos experimentais utilizando cultura

de células. Estudos complementares de biologia molecular como verificação da expressão das proteínas-alvo por western blot ou por PCR real time também serão realizados. Para aqueles bioativos que apresentarem resultados significativos nos ensaios in vitro e nos ensaios de cultura celular será realizado estudo de padronização da matéria-prima visando o desenvolvimento da formulação em um passo posterior. Paralelamente ao trabalho de prospecção o grupo já possui pelo menos dois bioativos em fase avançada nos estudos de atividades biológicas, nos quais serão desenvolvidos os trabalhos de caracterização da matéria-prima vegetal e desenvolvimento de formulação cosmética e farmacêutica. Espera-se com a realização do trabalho identificar produtos em potencial para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos ou cosméticos com atividade biológica relevante comprovada através de metodologia científica, contribuindo assim para o desenvolvimento da região amazônica no que se refere a exploração das suas riquezas naturais..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (3) / Doutorado: (2) .

Integrantes: Tatiana do Nascimento Pedrosa - Integrante / Emerson Silva Lima - Coordenador / Adley Antonini Neves de Lima - Integrante / Valdir Florencio da Veiga Junior - Integrante / Ana Paula de Araújo Boleti - Integrante / Anderson Cavalcante Guimarães - Integrante / Marne Carvalho de Vasconcellos - Integrante / Tatiane Pereira de Souza - Integrante / Pierre Alexandre dos Santos - Integrante / José Pereira de Moura Neto - Integrante / Edna Márcia Almeida Costa - Integrante / Marcela da Costa Barbosa - Integrante / Patrícia Danielle Oliveira de Almeida - Integrante / Lorena Freitas Barros Malaquias - Integrante / Fabiano de Sousa Vargas - Integrante.

2011 – Atual

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E COSMÉTICOS: ESTUDOS MOLECULARES, TOXICOLÓGICOS E TECNOLÓGICOS.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (2) .

Integrantes: Tatiana do Nascimento Pedrosa - Integrante / LIMA, Emerson Silva - Coordenador / Marne Carvalho de Vasconcellos - Integrante.

2006 – 2008

Caracterização fitoquímica e atividades farmacológicas de extratos das folhas do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* H.B.K.)

Descrição: Caracterização fitoquímica, estudo dos efeitos de extratos sobre a coagulação, agregação plaquetária, inflamação, dor, antioxidante, antihiperglicemiante e averiguação de possível efeito tóxico da espécie estudada, através de ensaios fitoquímicos, biológicos e bioquímicos, utilizando modelos experimentais in vitro e in vivo...

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Tatiana do Nascimento Pedrosa - Integrante / Débora Teixeira Ohana - Integrante / Emerson Silva Lima - Coordenador / Maria de Meneses Pereira - Integrante / Cecília Verônica Nunez - Integrante / Carlos Cleomir de Souza Pinheiro - Integrante / Carlos Victor Montefusco Pereira - Integrante / Maria José de Carvalho - Integrante.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2016

Melhor trabalho - Apresentação Oral - Categoria Doutorado - XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, Universidade de São Paulo.

2004

1º lugar nacional - 1º Olimpíada Brasileira de Saúde e Meio Ambiente da FIOCRUZ (Categoria: Arte e ciência), FIOCRUZ.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

1.

REDIGUIERI, CAROLINA ; PINTO, TEREZINHA ; BOU-CHACRA, NADIA ; GALANTE, RAQUEL ; ARAÚJO, GABRIEL ; **PEDROSA, TATIANA** ; MARIA-ENGLER, SILVYA S. ; DE BANK, PAUL . Ozone Gas as a Benign Sterilization Treatment for PLGA Nanofibre Scaffolds. Tissue Engineering. Part C, Methods, v. 1, p. 00000, 2016.

2.

PEDROSA, Tatiana do Nascimento; BARROS, A.O. ; NOGUEIRA, J. R. ; FRUET, A. C. ; RODRIGUES, I. C. ; SILVA, F. M. A. ; CALCAGNO, D. Q. ; SMITH, M. A. C. ; SOUZA, T. P. ; BARROS, S. B. M. ; VASCONCELLOS, M. C. ; KOOLEN, H. H. F. ; MARIA-ENGLER, S. S. ; LIMA, E.S. . Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (Libidibia ferrea Mart.) extracts. Archives of Dermatological Research (Print) **JCR**, v. 1, p. 1, 2016.

3.

YAMAGUCHI, K. K. L. ; VEIGA JUNIOR, V. F. ; **PEDROSA, T. N.** ; VASCONCELLOS, M.C. ; LIMA, Emerson Silva . Atividades biológicas dos óleos essenciais de Endlicheria citriodora, uma Lauraceae rica em geranato de metila. Química Nova (Impresso) **JCR**, v. 36, p. 826-830, 2013.

Citações: **WEB OF SCIENCE** = 1

4.

VASCONCELOS, Z. S. ; BARBOSA, G. S. ; **PEDROSA, T. N.** ; PINHEIRO JUNIOR, M. N. . Prevalência do vírus da Hepatite B nos pacientes atendidos em um hospital de referência da cidade de Manaus-Am no ano de 2009.. Revista Científica Literatus, v. 3, p. 42-47, 2011.

5.

★ CARVALHO, Maria José de ; **PEDROSA, Tatiana do Nascimento** ; GUILHON-SIMPLICIO, Fernanda ; NUNEZ, Cecília Verônica ; OHANA, Débora Teixeira ; PEREIRA, Maria de Meneses ; LIMA, Emerson Silva . Estudo farmacognóstico e atividade in vitro sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de Passiflora nitida Kunth (Passifloraceae). Acta Amazonica (Impresso) **JCR**, v. 40, p. 199-206, 2010.

Citações: **SciELO**3 | **SCOPUS**5

6.

★ **Tatiana do Nascimento Pedrosa**; SILVA, C. T. C. ; Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira ; OHANA, Débora Teixeira ; PONCIANO, A. E. F. ; AVELINO, J. G. C. ; LIMA, N. P. C. ; MARTIM, S. R. ; REIS, V. P. . AÇÃO SAÚDE: A UNIVERSIDADE LEVANDO INFORMAÇÃO À RÁDIO COMUNITÁRIA. Revista Ciência em Extensão, v. 6, p. 7-14, 2010.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1.

PEDROSA, T. N.; SILVA, C. T. C. ; AVELINO, J. G. C. ; CAVALCANTE, J. P. S. ; LIMA, N. P. C. ; MARQUES ; MARTIM, S. R. ; PONCIANO, A. E. F. ; REIS, V. P. ; OHANA, D. T. . Ação Saúde: A Universidade Levando Informação à Rádio Comunitária. In: 4º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária - CBEU, 2009, Dourados/MS. Anais do 4º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária - CBEU, 2009.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1.

MOREIRA, L. C. ; **PEDROSA, T. N.** ; BOZINIS, M. C. V. ; LIMA, E.S. . Avaliação de Eficácia do Extrato Bruto de uma Planta do Cerrado para Uso Dermocosmético. In: VIII Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão - VIII SEMINÁRIO DE PÓS GRADUAÇÃO, 2011, Goiás. Anais do VIII Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2011.

Resumos publicados em anais de congressos

1.

PEDROSA, Tatiana do Nascimento; ALBUQUERQUE, R. C. ; CATARINO, C. M. ; PENNACHI, P. C. ; GIMENES, F. ; CONSOLARO, M. E. L. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Recreating an Immune Responsive Skin in Vitro: Cross-Talking Between Reconstructed Human Epidermis (RHE) and Immune THP-1 Cells. In: XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA e 8º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, 2016, São Paulo - SP. ANAIS DA XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2016.

2.

PEDROSA, Tatiana do Nascimento; De VUYST, E. ; MOUND, A. ; ROUVROIT, C. L. ; MARIA-ENGLER, S. S. ; POUMAY, Y. . Role of Th2-Related Cytokines and Cholesterol Depletion in an In Vitro Model of Atopic Dermatitis. In: XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2016, São Paulo. Anais da XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2016.

3.

ZANONI, T. B. ; **PEDROSA, T. N.** ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Epidermal equivalent assay: A useful tool to predict toxicity and sensitization potential of ingredients used in permanent hair dyes.. In: 51st Congress of the European Societies of Toxicology, 2015, Porto - Portugal. Toxicology Letters Special Issues - Abstracts of the 51st Congress of the European Societies of Toxicology, 2015. v. 238. p. S189.

4.

COSTA, G. R. ; **PEDROSA, T. N.** ; ALBUQUERQUE, R. C. ; MARIA-ENGLER, S. S. ; LAJOLO, N. M. A. ; ONG, T. P. . Blackberry (*Rubus* spp.) and gruxiama (*Eugenia brasiliensis* lam) ellagitannins-enriched extracts induced cell death in human breast cancer cell lines. In: FoRC Symposium: Advances in Food Science and Nutrition, 2015, São Paulo. FoRC Symposium: Advances in Food Science and Nutrition, 2015.

5.

PEDROSA, Tatiana do Nascimento; CATARINO, C. M. ; PENNACHI, P. C. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. . A Novel Reconstructed Human Epidermis Model for Skin Irritation Tests. In: XX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of The Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo and 7th Annual Research Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2015, São Paulo - SP. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. v. 51.

6.

ZANONI, T. B. ; **PEDROSA, T. N.** ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Mixture of ingredients used in permanent hair dye leads to morphological change, increases cell death and DNA fragmentation in in vitro epidermal reconstructs. In: 9th CTDC and XIX CBTx, 2015, Natal-RN-Brasil. Applied Research in Toxicology, 2015. v. 1. p. 39.

7.

PEDROSA, T. N.; ALBUQUERQUE, R. C. ; CATARINO, C. ; PENNACHI, P. C. ; FRUET, A. C. ; GIMENES, F. ; ASSIS, S. R. ; CONSOLARO, M. E. L. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Development of an in vitro epidermal model to evaluate skin sensitization. In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (9º CTDC) e XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2015, Natal - RN. Applied Research in Toxicology, 2015. v. 1. p. 33.

8.

MARIA-ENGLER, S. S. ; IMICH, A. P. ; FRUET, A. C. ; FERRUCIO, B. ; CATARINO, C. M. ; ALVES, D. K. ; FLORES, F. F. ; TURRA, K. ; CREPALDI, M. C. ; CATALANI, L. H. ; SANTOS, M. T. ; TAMACHIRO, N. ; GOMES, L. O. ; CASARI, P. K. ; PENNACCHI, P. C. ; MASSARO, R. R. ; **PEDROSA, T. N.** ; ROMANO, S. ; SANDRI, S. ; ZANONI, T. B. ; BARROS, S. B. M. . Artificial Skin in Perspective of Alternative Methods to Animal Experimentation in Brazil.. In: FutureTox II: In Vitro Data and In Silico Models for Predictive Toxicology, 2014, Chapel Hill, North Carolina. FutureTox II: In Vitro Data and In Silico Models for Predictive Toxicology, 2014.

9.

CATARINO, C. ; PENNACHI, P. ; **PEDROSA, T. N.** ; BARROS, S. ; MARIA-ENGLER, S. S. . In vitro skin corrosion as a pre-validation study of Reconstructed Human Epidermis in house developed. In: 9th World Congress on Alternative and Animal Use in the Life Sciences, 2014, Prague. Abstracts of the 9th World Congress, Prague, 2014, 2014. v. 3. p. 299-300.

10.

PEDROSA, T. N.; CATARINO, C. M. ; PENNACCHI, P. C. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Reconstruction of Human Epidermis Equivalent as Platform for Skin Irritation Risk Assessment. In: II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2014, Búzios. Abstracts Book - II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2014. p. 2-2.

11.

CURSINO, L. M. C. ; FACHIN-ESPINAR, M. T. ; **PEDROSA, T. N.** ; VASCONCELLOS, M. C. ; SALOME, K. S. ; BARISON, A. ; NUNEZ, C. V. . Antitumour and Antioxidant Activities Evaluation of Compounds and Extracts from *Minquartia guianensis*. In: Proceedings of the 2nd International PSE Symposium on Natural Compounds in cancer Prevention and Therapy, 2013. Trends in Natural Product Research, 2013. p. 60.

12.

PEDROSA, T. N.; CARVALHO, A. S. C. ; SANTOS, A. S. ; CALCAGNO, D. Q. ; SMITH, M. A. C. ; LIMA, E. S. ; MARIA-ENGLER, S. S. ; VASCONCELLOS, M. C. . Novel Kojic Acid derivatives act on melanogenesis and skin age-related enzymes. In: Antioxidants and Redox Process in Health - Satellite Meeting of 6th International Conference of Polyphenols and Health and VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine-South America, 2013, São Paulo. Program and Abstracts of Antioxidants and Redox Process in Health - Bilateral Meeting Brazil - Japan, 2013.

13.

MOREIRA, L. C. ; BOZINIS, M. C. V. ; **PEDROSA, T. N.** ; LIMA, E. S. . Avaliação de eficácia e segurança do extrato bruto de uma espécie da família myrtaceae para uso como dermocosmético.. In: FESBE REGIONAL 2012, 2012, Maceio. ANAIS DA FESBE, 2012. v. 1.

14.

GUILHON-SIMPLICIO, F. ; SOUZA, E. N. C. ; MACHADO, T. M. ; **PEDROSA, T. N.** ; RALPH, A. C. L. ; VASCONCELLOS, M. C. . Efeito de triterpeno isolado da casca de *Byrsonima japurensis* A. Juss. sobre células tumorais. In: VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, 2012, Ponta Grossa. Anais do VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, 2012.

15.

NOGUEIRA, J. R. ; **PEDROSA, T. N.** ; LIMA, A. A. N. ; LIMA, E. S. ; VASCONCELLOS, M. C. . Evaluation of Enzyme Inhibition with cosmetic activity by extract of bark and seed of *Myrciaria dubia*. In: I congresso da Associação Brasileira de Ciências

Farmacêuitcas - ABCF, 2012, Porto de Galinhas. Anais do I congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuitcas - ABCF, 2012. v. 1. p. 1-1.

16.

PEDROSA, T. N.; NOGUEIRA, J. R. ; VASCONCELLOS, M. C. ; LIMA, Emerson Silva . Effect of extracts of bark and seed of 'Camu-camu' (*Myrciaria dubia*) on hemolysis, antioxidant and skin diseases-related enzymes. In: IV Workshop sobre desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos, 2012, Manaus-AM. IV Workshop sobre desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos, 2012.

Apresentações de Trabalho

1.

PEDROSA, T. N.. 'Métodos alternativos ao uso de animais no Brasil'. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2.

PEDROSA, T. N.; ALBUQUERQUE, R. C. ; CATARINO, C. M. ; PENNACCHI, P. C. ; FRUET, A. C. ; GIMENES, F. ; CONSOLARO, M. E. L. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Development of an in vitro epidermal model to evaluate skin sensitization. 2015. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

3.

PEDROSA, T. N.; CATARINO, C. M. ; PENNACHI, P. C. ; BARROS, S. B. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. . Reconstruction of Human Epidermis Equivalent as Platform for Skin Irritation Risk Assessment. 2014. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

4.

PEDROSA, T. N.; SILVA, C. T. C. ; OHANA, D. T. ; AVELINO, J. G. C. ; CAVALCANTE, J. P. S. ; LIMA, N. P. C. ; MARQUES ; MARTIM, S. R. ; PONCIANO, A. E. F. ; REIS, V. P. ; SILVA, A. M. . AÇÃO SAÚDE: A UNIVERSIDADE LEVANDO INFORMAÇÃO À RÁDIO COMUNITÁRIA. 2009. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

5.

PEDROSA, T. N.; OHANA, D. T. ; FERREIRA, J. R. D. ; AVELINO, J. G. C. ; LIMA, N. P. C. ; MARTIM, S. R. ; PONCIANO, A. E. F. ; REIS, V. P. ; SANTOS ; SILVA, B. M. . Campanha Pelo Uso Racional de Medicamentos: A Experiência da Parceria Entre o Centro Acadêmico de Farmácia (CAFARMA) e o Programa de Educação Tutorial (Pet) do Curso de Farmácia. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6.

PEDROSA, T. N.; PAES, E. R. C. ; SANTOS, V. A. ; COSTA, L. M. ; LOPES, M. C. C. ; SANTOS, R. L. ; OLIVEIRA, G. G. C. G. . Doses Mínima E Máxima Dos Medicamentos Padronizados No Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV).. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

7.

PEDROSA, T. N.; SILVA, B. M. ; PAES, E. R. C. ; ..., . Avaliação da Terapia Medicamentosa Utilizada por Idosos freqüentadores do Parque Municipal do Idoso localizado na cidade de Manaus-Am. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

8.

SILVA, C. T. C. ; SILVA, B. M. ; AVELINO, J. G. C. ; **PEDROSA, T. N. ; ...**, . Prevenção e informação: Saúde e Qualidade de vida. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9.

OHANA, D. T. ; **PEDROSA, T. N. ;** FERREIRA, J. R. D. ; PONCIANO, A. E. F. ; ..., . PET CRIANÇA FELIZ. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

10.

OHANA, D. T. ; FERREIRA, J. R. D. ; **PEDROSA, T. N.** ; ..., . Campanha de Doação Sanguínea, Esclarecimento e Captação de Novos Doadores Resultantes da Parceria entre a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (Fhemoam) e Pet-Farmácia. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

11.

AZEVEDO, M. E. F. ; SANTOS ; **PEDROSA, T. N.** ; ..., . Ações Educativas na Prevenção de Doenças Microbianas e Enteroparasitoses. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

12.

FERREIRA, J. R. D. ; OHANA, D. T. ; **PEDROSA, T. N.** ; ..., . Ciclo de Palestras Realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

13.

SILVA, C. T. C. ; OHANA, D. T. ; **PEDROSA, T. N.** ; ..., . Educando para a Saúde. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

14.

PEDROSA, T. N.; OHANA, D. T. ; ALKMIN, C. B. ; BEZERRA, L. L. R. ; CAVALCANTE, J. P. S. ; BATISTA, T. G. ; MARQUES . Palestras Sobre o Profissional Farmacêutico em Escolas da Rede Pública de Ensino. 2006. (Apresentação de Trabalho/Outra).

15.

OHANA, D. T. ; **PEDROSA, T. N.** ; OLIVEIRA, V. X. ; ALKMIN, C. B. ; BARBOSA, G. S. ; BATISTA, T. G. ; BEZERRA, L. L. R. ; CAVALCANTE, J. P. S. ; DIAS, D. V. ; ..., . Curso Preparatório para Vestibular com Aulas de Biologia e Química para Alunos da Comunidade em Geral.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Outra).

16.

OHANA, D. T. ; **PEDROSA, T. N.** ; PASSOS, I. M. ; URATANI, M. H. ; SILVA, V. R. C. ; ALKMIN, C. B. ; BATISTA, T. G. ; BEZERRA, L. L. R. ; CAVALCANTE, J. P. S. ; ..., . O Uso do Microscópio para Visualizar Estruturas, Componentes Celulares e Parasitas Intestinais na Semana Nacional de Ciência & Tecnologia. 2006. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1.

PEDROSA, T. N.; SILVA, C. T. C. . Programa Ação Saúde. 2008. (Programa de rádio ou TV/Outra).

Demais tipos de produção técnica

1.

PEDROSA, T. N.; OHANA, D. T. ; MARQUES ; CAVALCANTE, J. P. S. ; DIAS, D. V. ; MELO, D. M. . Curso de Química Preparatório para Vestibular. 2007. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

2.

PEDROSA, T. N.; MARQUES ; ALKMIN, C. B. ; BEZERRA, L. L. R. ; BATISTA, T. G. ; OHANA, D. T. . O Uso do Microscópio para Visualização de Estruturas, Componentes Celulares e Parasitas Intestinais em Escolas de Ensino Fundamental e Médio. 2006. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Produção artística/cultural

Artes Cênicas

1.

★ OLIVEIRA, O. ; **PEDROSA, T. N.** . "Iguarapé". 2004. Teatral.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

Workshop: Métodos Alternativos em Cosméticos: Atualização nos Aspectos Tecnológicos e Regulatórios. 2014. (Simpósio).

2.

VIII Seminário Internacional de Farmacêuticos. 2010. (Seminário).

3.

XVI Congresso Paulista de Farmaceuticos. 2010. (Congresso).

4.

4º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária - CBEU. AÇÃO SAÚDE: A UNIVERSIDADE LEVANDO INFORMAÇÃO À RÁDIO COMUNITÁRIA. 2009. (Congresso).

5.

51º Congresso Nacional da União Nacional dos Estudantes. 2009. (Congresso).

6.

6a Semana Nacional de Ciência e Tecnologia."Na trilha da saúde: Noções sobre o Uso Racional de Mediamentos". 2009. (Outra).

7.

II Congresso de Extensão. "Campanha Pelo Uso Racional de Medicamentos: A Experiência da Parceria Entre o Centro Acadêmico de Farmácia (CAFARMA) e o Programa de Educação Tutorial (Pet) do Curso de Farmácia". 2009. (Congresso).

8.

Workshop: "A Comunicação e a Saúde: A Necessidade de um Uso Criterioso dos Medicamentos". 2008. (Outra).

9.

30º Encontro Nacional dos Estudantes de Farmácia. 2007. (Encontro).

10.

III Conferência Estadual de Segurança Alimentar e Nutricional do Estado do Amazonas. 2007. (Outra).

11.

IV Semana Nacional de Ciência & Tecnologia.Expositora pelo PET-Farmácia UFAM do tema "Da Planta ao perfume". 2007. (Outra).

12.

Oficina de Rádio Comunicação. 2007. (Oficina).

13.

III Semana Nacional de Ciência e Tecnologia.Instrutor de Oficina "O Uso do Microscópio para Visualização de Estruturas, Componentes Celulares e Parasitas Intestinais em Escolas de Ensino Fundamental e Médio". 2006. (Outra).

14.

II Mostra Interinstitucional de Extensão.Palestras Sobre o Profissional Farmacêutico em Escolas da Rede Pública de Ensino. 2006. (Outra).

15.

II Seminário CIT Manaus de Toxicologia: MercURY, Malaria and Autoimmune Disease. 2006. (Seminário).

16.

IV ECONPET ? Encontro Centro-Oeste e Norte do Programa de Educação Tutorial. 2006. (Encontro).

17.

II Semana Nacional de Ciência e Tecnologia.Participação como expositora do tema parasitoses transmitidas pela água. 2005. (Outra).

18.

I Jornada Amazonense de Plantas Medicinais. 2005. (Outra).

19.

I Seminário CIT Manaus de Toxicologia: Mercúrio na Amazônia. 2005. (Seminário).

20.

Reunião Regional da SBPC ? Manaus ? Am. 2005. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1.

PEDROSA, T. N.; SANTOS ; OHANA, D. T. ; FERREIRA, J. R. D. ; I Campanha 05 de maio pelo Uso Racional de Medicamentos - Manaus AM. 2009. (Outro).

2.

MENECHINI ; **PEDROSA, T. N.** ; SANTOS ; ALEIXO, S. A. ; MATHIAS ; OLIVEIRA ; PINTO ; SILVA . I Encontro de Estudantes de Farmácia do Estado do Amazonas - EEFAM. 2007. (Outro).

3.

MENEGHINI ; OHANA, D. T. ; **PEDROSA, T. N.** ; PASSOS, I. M. ; MARQUES ; ALKMIN, C. B. ; BARBOSA, G. S. ; URATANI. M. H. ; BEZERRA, L. L. R. ; DIAS, D. V. ; MELO, D. M. ; BATISTA, T. G. ; OLIVEIRA, V. X. ; SILVA, V. R. C. . II Mostra Interinstitucional de Extensão. 2006. (Exposição).

4.

OHANA, D. T. ; **PEDROSA, T. N.** ; MIRANDA, C. B. ; MARQUES ; OLIVEIRA, V. X. ; ALKMIN, C. B. ; BARROS, A.O. ; BARBOSA, G. S. ; URATANI. M. H. . IV Encontro Centro-Oeste e Norte do Programa de Educação Tutorial - ECONPET. 2006. (Congresso).

Outras informações relevantes

- Presidente do Centro Acadêmico de Farmácia da UFAM por dois mandatos consecutivos;
- Representante discente do curso de farmácia. - Diretora de cultura do Diretório Central dos Estudantes (DCE- UFAM). - Representante Discente dos alunos da UFAM na comissão eleitoral formada para conduzir as eleições de novo reitor em 2010.