

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas**

Desenvolvimento de Pele Humana Reconstruída Contendo Equivalente Dérmico Glicado  
na Avaliação da Eficácia e Toxicidade de Compostos anti-glicação

Paula Comune Pennacchi

**São Paulo  
2016**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas**

Desenvolvimento de Pele Humana Reconstruída Contendo Equivalente Dérmico Glicado  
na Avaliação da Eficácia e Toxicidade de Compostos anti-glicação

Paula Comune Pennacchi

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

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora:  
Professora Doutora Silvy Stuchi Maria-Engler

**São Paulo  
2016**



**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de  
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
  - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato) é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.
  - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
  - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós Graduação:  
[pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Profa. Dra. Irene da Silva Soares  
Presidente da CPG/FCF/USP

Paula Comune Pennacchi

Desenvolvimento de Pele Humana Reconstruída Contendo Equivalente Dérmico Glicado  
na Avaliação da Eficácia e Toxicidade de Compostos anti-glicação

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Silvy Maria-Engler

Orientadora/Presidente

---

1º. Examinador

---

2º. Examinador

---

3º. Examinador

---

4º. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

*Dedico esta tese aos meus pais, Gilberto e Claudete Pennacchi.*

*"Ser profundamente amado por alguém nos dá força; amar alguém profundamente nos dá coragem." Lao-Tsé.*

*Vocês são minha força, minha motivação e meu lar.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Professora Silvy Stuchi Maria-Engler por, desde o primeiro dia, ver em mim uma capacidade maior do que eu mesma acreditava ter, por confiar em mim e me fazer uma cientista. Agradeço à Professora Silvia Berlanga de Moraes Barros, pelos inúmeros conselhos científicos e lições de vida. A contribuição de vocês foi muito além do aspecto profissional, e terão para sempre a minha gratidão e meu carinho.

Agradeço aos Professores parceiros, que colaboraram para o sucesso de nosso trabalho: Professora Marinilce Fagundes dos Santos (ICB-USP), Professor Enrique Boccardo (ICB-USP), Professor Luis Henrique Catalani (IQ-USP), Professora Marisa Passarelli (FMUSP), Professora Maria Lúcia Giannella (FMUSP), Professor Rui Jaeger (ICB-USP), Professora Ana Campa (FCF-USP), Professor Ricardo Fock (FCF-USP), Professor Luciano Fontoura da Costa (IF-USP, São Carlos) e seus alunos, os doutorandos Henrique Ferraz de Arruda e Cesar Henrique Comin, à Professora Márcia Edilaine Lopes Consolaro (UEM-PR) e Pós-doutora Fabrícia Gimenes. Agradeço também ao Professor Maurício da Silva Baptista (FCF-USP) e à Diretora Professora Terezinha de Jesus Andreoli Pinto (FCF-USP) pelo apoio durante a regularização de meu doutorado sanduíche. Agradeço ao Professor Daniel Asselineau e ao Doutor Hervé Pagon por me receberem no “*Laboratoire de Derme et Vieillessement - L’Oréal Research & Innovation Institute*” e por colaborarem para minha formação profissional. Agradeço aos Professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF) que sempre nos abriram as portas de seus laboratórios. Aos técnicos que ofereceram suporte aos nossos experimentos, em especial ao Setor de Técnicas Histológicas do Instituto de Ciências Biomédicas ICB I-USP e ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa CEFAP-USP.

Agradeço aos meus primeiros mestres, Professor Tomaz Henrique Araújo e Professora Maria Rita Rodrigues que me abriram a primeira porta e me apresentaram à pesquisa científica e à minha colega e amiga Cláudia Ferreira que me ensinou a persistir.

Agradeço aos colegas que trabalharam ao meu lado nesse projeto, os estudantes de Iniciação Científica Octávio Gomes e Maria Clara Crepaldi, à Doutora Maíra E.S. de Almeida e à Pós-doutora Fernanda Faião-Flores, e aos meus colegas e amigos do Laboratório de Citopatologia: Michelle Diaccciati, Silvana Sandri, Érica Oliveira, Thalita Zaroni, Bianca Ferruccio, Manoela Tiago, Débora Alves, Renato Massaro, Tatiana Pedrosa, Kely Turra, Carolina Catarino, Nayane de Souza, Andréa Fruet, Raquel Haga, Gustavo Takashi, Gabriela Toledo e Silvia Cardoso. Cada um à sua maneira me ensinaram muito além da ciência e tornaram a caminhada mais divertida. Em especial, agradeço à Silvia Romano pela enorme paciência com todos nós.

Agradeço a todos os meus amigos, que mesmo à distância nunca deixaram de estar presentes nos meus pensamentos e no meu coração.

Em especial agradeço às fontes de fomento: CNPq (processos 152764/2011-9), CNPq-RENAMA (405432/2012), INCT-if e FAPESP (processos 2011/14327-6; 2011/22812-1 e 2011/07441-7).

Finalmente agradeço à minha família. Meus irmãos, cunhados e sobrinhos, sempre curiosos. E aos meus pais, que são a razão de tudo isso. O amor de vocês me faz maior, e nenhum desafio é grande demais se vocês estão ao meu lado. São suas todas as minhas conquistas.

*"Don't gain the world & lose your soul, wisdom is better than silver or gold."*

*Bob Marley*



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA.....	17
1.2	DIABETES MELLITUS.....	22
1.3	ENVELHECIMENTO DE PELE.....	25
1.4	PELE HUMANA RECONSTRUÍDA <i>IN VITRO</i> .....	29
1.5	APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	33
1.6	COMPOSTOS ANTI-GLICAÇÃO.....	35
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	<i>CONDIÇÕES DE CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES</i> .....	39
3.2	<i>ISOLAMENTO CELULAR</i> .....	40
3.3	<i>CULTIVO DE QUERATINÓCITOS: ADEQUAÇÃO DE PROTOCOLO</i> .....	43
3.4	<i>ENSAIO DE CITOTOXIDADE DOS COMPOSTOS ANTI-GLICAÇÃO</i> .....	46
3.5	<i>OBTENÇÃO DE COLÁGENO TIPO I</i> .....	47
3.6	<i>DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE GLICAÇÃO “IN VITRO” DE COLÁGENO TIPO I</i> .....	48
3.7	<i>MENSURAÇÃO DA GLICAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I POR FLUORIMETRIA</i> .....	49
3.8	<i>GERAÇÃO DE PELE HUMANA RECONSTRUÍDA CONTENDO EQUIVALENTE DÉRMICO GLICADO</i> .....	50
3.9	<i>AValiação MORFOLÓGICA DA PELE ARTIFICIAL GLICADA</i> .....	52
3.10	<i>ANÁLISE DA PELE RECONSTRUÍDA GLICADA POR MICROSCOPIA CONFOCAL MULTIFÓTON</i> .....	52
3.11	<i>ANÁLISE MATEMÁTICA DA ALTERAÇÃO DAS FIBRAS COLAGÊNICAS PELA GLICAÇÃO</i> .....	53
3.12	<i>AValiação IMUNOHISTOQUÍMICA DA PELE ARTIFICIAL GLICADA</i> .....	54
3.13	<i>AValiação DOS PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGÊS) VIA KIT ELISA</i> .....	56
3.14	<i>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA VIA PCR PARA: CITOQUERATINAS 10 E 14, DESMOGLEÍNA E E-CADERINA</i> .....	56
3.15	<i>ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA VIA WESTERN BLOT</i> .....	57
3.16	<i>ANÁLISE DOS RESULTADOS</i> .....	58
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
4.1	<i>ENSAIO DE CITOTOXICIDADE</i> .....	59
4.2	<i>OBTENÇÃO DO COLÁGENO TIPO I</i> .....	61
4.3	<i>GLICAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO TIPO I</i> .....	62
4.4	<i>CONFECÇÃO DA PELE HUMANA RECONSTRUÍDA</i> .....	67
4.5	<i>ANÁLISE MORFOLÓGICA DA PELE RECONSTRUÍDA</i> .....	69
4.6	<i>ANÁLISE MULTIFOTÔNICA DA PELE RECONSTRUÍDA GLICADA</i> .....	73
4.7	<i>ANÁLISE MATEMÁTICA DAS ALTERAÇÕES NAS FIBRAS COLAGÊNICAS PELA GLICAÇÃO</i> .....	77
4.8	<i>PADRÃO DE DIFERENCIAÇÃO DÉRMICA E ESTRATIFICAÇÃO EPITELIAL DA PELE RECONSTRUÍDA GLICADA</i> .....	79
4.9	<i>ANÁLISE DA GERAÇÃO DE AGÊS NAS PELES RECONSTRUÍDAS</i> .....	89
4.10	<i>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA VIA PCR PARA: CITOQUERATINAS 10 E 14, DESMOGLEÍNA E E-CADERINA</i> .....	91
4.11	<i>ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE P21 VIA WESTERN BLOT</i> .....	94
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>PRODUÇÃO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA.....</b>	<b>97</b>
6.1	<i>PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS</i> .....	97
6.2	<i>ATIVIDADES DIDÁTICAS</i> .....	98
6.2.1	<i>Visita Técnica</i> .....	98
6.2.2	<i>Aulas Ministradas</i> .....	99
6.3	<i>COLABORAÇÕES EM PROJETOS DE PESQUISA</i> .....	99
6.4	<i>COLABORAÇÃO EM PROJETOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA</i> .....	100

6.5	<i>TREINAMENTO DE ESTUDANTES</i> .....	101
6.6	<i>MANUSCRITOS PUBLICADOS OU EM VIAS DE PUBLICAÇÃO</i> .....	102
6.7	<i>FORMAÇÃO COMPLEMENTAR</i> .....	103
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da formação dos AGEs.....	18
Figura 2. Ferida em pé diabético. Fonte: Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação .....	24
Figura 3. Envelhecimento cutâneo observado após exposição prolongada à radiação ultravioleta. ....	27
Figura 4. Isolamento de células a partir de pele humana. À esquerda, em cima: pele de prepúcio. À esquerda em baixo: fragmentação do tecido após limpeza e esterilização. À direita: separação mecânica de derme e epiderme. Fonte: do autor. ....	40
Figura 5. Fotomicrografia representativa das culturas de células de pele isoladas a partir de prepúcio.....	43
Figura 6. Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para detecção de HPV por PCR em gel de agarose 1,5%. M: marcador de 100pb .....	45
Figura 7. Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para sete microrganismos usando PCR multiplex em gel de poliacrilamida 8%. Todas as amostras foram negativas .....	46
Figura 8. Fotomicrografia dos fibroblastos humanos frente ao composto anti-glicante Aminoguanidina (AG) nas diferentes concentrações. Aumento 20x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo) .....	60
Figura 9. Viabilidade dos fibroblastos humanos (% de células viáveis) frente à molécula anti-glicante Aminoguanidina em diversas concentrações nos tempos de 24, 48 ou 72 horas de exposição. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo) .....	60
Figura 10. Fotomicrografia dos fibroblastos humanos frente ao composto anti-glicante Carnosina (C) nas diferentes concentrações. Aumento 20x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo) .....	60
Figura 11. Viabilidade dos fibroblastos humanos (% de células viáveis) frente à molécula anti-glicante Carnosina em diversas concentrações e tempos de exposição de 24, 48 ou 72 horas. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo) .....	61
Figura 12. Representação do colágeno tipo I glicado. Tubo à esquerda: aspecto do gel de colágeno extraído de cauda de rato adulto saudável. Tubo à direita: colágeno extraído de rato diabético. Esquema do “cross-link” nas fibras de colágeno tipo I adaptado de <a href="http://www.life-enhancement.com/magazine/article/369-more-evidence-for-eye-health-lower-age-with-acetyl-l-carnitine">http://www.life-enhancement.com/magazine/article/369-more-evidence-for-eye-health-lower-age-with-acetyl-l-carnitine</a> , acesso em 24/outubro/2015 .....	61
Figura 13. Aferição de autofluorescência. A: albumina sérica humana controle; B: albumina sérica humana diabética; C: colágeno de ratos jovens; D: colágeno de ratos idosos; E: colágeno de ratos diabéticos. Comprimento de onda de excitação: 328nm e emissão 378nm para	

- pentosidina. Experimento realizado em triplicata (n=3 por grupo). (\*\*p<0,001). U.A.Luz: unidades arbitrárias de luz..... 62
- Figura 14. Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle ou glicado por Ácido Glicóxico. Excitação de 328nm e emissão de 378nm, específica para pentosidina. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz. .... 64
- Figura 15. Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle ou glicado por Ribose 10mM. Excitação de 328nm e emissão de 378nm, específica para pentosidina. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo). \*(p<0,05). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz..... 64
- Figura 16. Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle ou glicado por Glicoxilato de Sódio. Excitação de 328nm e emissão de 378nm, específica para pentosidina. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo). \*\*\*(p<0,001). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz..... 65
- Figura 17: Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle, incubado com ribose 10mM por 1 mês ou incubado com ribose 10mM na presença do inibidor aminoguanidina (AG) em 10, 15, 20, 25 ou 30mM por 1 mês. Excitação de 370nm e emissão de 440nm, abrangente para AGEs totais. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo) \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz..... 66
- Figura 18: Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle, incubado com glicoxilato de sódio ou com glicoxilato de sódio na presença dos inibidores aminoguanidina (AG) ou carnosina (C). Excitação de 370nm e emissão de 440nm, representativa para AGEs totais \*\*\*(p<0,001). Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz..... 67
- Figura 19. Fluorimetria de colágeno tipo I controle, glicado com glicoxilato de sódio ou em diluições graduais (controle + glicado). As porcentagens referem-se à proporção de colágeno glicado presente na amostra. Excitação 370nm, emissão 440nm, referente à AGEs totais. \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001). Experimento realizado em sextuplicata experimental (n=6 por grupo). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz ..... 68
- Figura 20. Aspecto macroscópico das PHRs controle, glicada (glicoxilato de sódio), glicada tratada com aminoguanidina 30mM ou com carnosina 30mM ..... 69
- Figura 21. Fotomicrografia de pele humana nativa, secção de 5µm em parafina histológica, corada com Hematoxilina & Eosina, em aumento de 40x. .... 69
- Figura 22. Fotomicrografia de PHR, A. controle, B. glicada com Ribose 10mM e C. glicada com Ribose 10mM na presença de aminoguanidina (AG) 30mM, coradas com Hematoxilina & Eosina, em aumento de 20x e detalhe à direita em 40x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo). .... 70
- Figura 23. Fotomicrografia de PHR. A: controle; B: glicada com glicoxilato de sódio; C: glicada com glicoxilato de sódio na presença de aminoguanidina 30mM. Coradas com Hematoxilina & Eosina. Aumento de 20x e detalhe à direita em 40x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo). .... 71
- Figura 24. Aspecto morfológico das peles controles e glicadas com ribose 10mM. Coluna à esquerda: A: PHR controle; B. PHR glicada; C: PHR tratada com AG. Na coluna central (A.1, B.1

e C.1) a imagem representativa da reflexão, indicativo das fibras íntegras de colágeno tipo I (em verde) via geração de luz em segundo harmônico (SHG) por microscopia confocal multifóton (Zeiss LSM 780 NLO). A epiderme está apresentada em vermelho e representa o espectro de transmissão (células). Coluna à direita: detalhe ampliado da trama colagênica. Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo). ..... 74

Figura 25. Aspecto morfológico das PHRs controles e glicadas glioxilato de sódio ou tratadas com AG 30mM. Coluna à esquerda: morfologia por coloração Hematoxilina & Eosina. Coluna central: imagem representativa da reflexão, indicativo das fibras íntegras de colágeno tipo I (em verde) via geração de luz em segundo harmônico (SHG) por microscopia confocal multifóton (Zeiss LSM 780 NLO). A epiderme está apresentada em vermelho e representa o espectro de transmissão (células). Coluna à direita: detalhe ampliado da trama colagênica. Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo). ..... 75

Figura 26: Análise matemática do padrão das tramas colagênicas. A e B: análise do colágeno por SHG. C e D: detalhe da trama colagênica com pontos vermelhos indicativos dos pontos de maior compressão do colágeno. E e F: alteração fenotípica dos fibroblastos imersos na MEC controle ou glicada, corados por Hematoxilina & Eosina, aumento de 40x. G: quantificação dos pixels indicativos de compressão do colágeno. A análise matemática foi realizada pela equipe do Professor Luciano Fontoura, do IF-USP São Carlos-SP. Foram enviadas para análise 6 imagens para cada grupo experimental (n=6 por grupo). ..... 78

Figura 27: Fotomicrografia de marcadores de diferenciação epitelial. Pele reconstruída controle, glicada (glioxilato de sódio) e glicada tratada com aminogunidina 30mM. 1ª coluna: coradas com Hematoxilina & Eosina; 2ª coluna: imunomarcadas para detecção de Citoqueratina-10; 3ª coluna: Citoqueratina-14 e 4ª coluna: BrdU. Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). As linhas tracejadas se referem ao limite da membrana basal e as linhas pontilhadas se referem ao limite entre o estrato basal e os estratos superiores da epiderme. .... 80

Figura 28. Fotomicrografia para marcação de CML. Pele reconstruída controle, glicada (glioxilato de sódio) ou tratada com aminogunidina 30mM, coradas com Hematoxilina-Eosina (1ª coluna) ou imunomarcadas para detecção de Carboximetil-lisina (2ª coluna). Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). As linhas tracejadas se referem ao limite da membrana basal. .... 82

Figura 29. Fotomicrografia para marcadores Vimentina e alfa-SMA. Pele reconstruída controle, glicada (glioxilato de sódio) ou tratada com aminogunidina 30mM, coradas com Hematoxilina & Eosina (1ª coluna) ou imunomarcadas para detecção de Vimentina (2ª coluna) ou Alfa-SMA (3ª coluna). Aumento de 20x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). ..... 85

Figura 30. Fotomicrografia para marcadores E-Caderina e Desmogleína. Pele reconstruída controle, glicada (glioxilato de sódio) ou tratada com aminogunidina 30mM, coradas com Hematoxilina & Eosina (1ª coluna), imunomarcadas para detecção de E-caderina (2ª coluna) ou desmogleína (3ª coluna). Aumento de 20x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). ..... 87

Figura 31. Fotomicrografia para marcador de DNA fragmentado, TUNEL. Pele reconstruída controle, glicada (glioxilato de sódio) ou tratada com aminogunidina 30mM, coradas com Hematoxilina & Eosina (1ª coluna) ou imunomarcadas para detecção de DNA fragmentado (2ª coluna). Aumento de 20x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). A linha tracejada representa a divisão entre derme e epiderme. .... 88

Figura 32. AGEs totais em lisado de pele (via ELISA). Experimento realizado em triplicata experimental (n=6 por grupo). ..... 89

Figura 33. Expressão de CML na epiderme das peles reconstruídas. A, B e C: morfologia da PHR, coloração por Hematoxilina & Eosina. D, E e F: Imunomarcção para CML. G: Western blotting para CML. Experimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo), quantificação das bandas realizada pelo software <i>Image J</i> . ....	90
Figura 34. Expressão gênica dos marcadores de diferenciação epitelial CK-10 e CK-14. Experimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo). (*p<0,05). As linhas tracejadas se referem ao limite da membrana basal. ....	92
Figura 35: Expressão gênica dos marcadores de adesão celular E-caderina e desmogleína-1. Experimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo). (*p<0,05) (**p<0,001).....	93
Figura 36. Expressão da proteína p21 via <i>Western blotting</i> . ....	94
Figura 37. Resumo das características da PHRs .....	96

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de AGEs separados conforme sua característica de autofluorescência.....	19
Tabela 2. Compostos anti-AGEs.....	35
Tabela 3: Suplementos utilizados no preparo do meio RAFT. ....	51
Tabela 4. Diluições dos anticorpos primários utilizados nas imunomarcações .....	55
Tabela 5: Componentes do tampão de lise celular, RIPA. ....	57
Tabela 6: Resumo dos resultados alcançados. ....	95

## RESUMO

PENNACCHI, P. C. Desenvolvimento de Pele Humana Reconstruída Contendo Equivalente Dérmico Glicado na Avaliação da Eficácia e Toxicidade de Compostos anti-glicação. 2015. 170f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A glicação não enzimática das proteínas é um fator comum para a fisiopatologia de uma série de transtornos relacionados ao envelhecimento e a doenças como o diabetes mellitus (DM). O geração dos produtos de glicação, os AGEs (do inglês: *Advanced Glycation End Products*) se dá através de reações de glicação da matriz extracelular (MEC) na derme e têm sido apontado como um dos fatores responsáveis pela perda de elasticidade e deficiência de cicatrização da pele. A permeação cutânea de compostos anti-AGE é uma limitação importante para eficiência terapêutica de compostos que devem atingir camadas mais profundas da pele. Modelos de pele reconstruída contendo equivalente dérmico glicado são estruturas tridimensionais geradas *in vitro* que mimetizam a pele humana e representam um eficiente modelo para o estudo de células e modificações provocadas na MEC no processo de envelhecimento e DM. O modelo 3D de pele reconstruída tem características metabólicas, de permeabilidade e atividade semelhantes à da pele original, potencializando seu papel nas investigações sobre permeabilidade de drogas, toxicidade, irritação, eficácia e segurança de compostos e diferenciação de queratinócitos. Uma série de compostos naturais ou sintéticos inibidores de AGEs têm sido descobertos e apresentados recentemente e podem representar inovação terapêutica no tratamento de modificações causadas pela formação e acúmulo destes AGEs também na pele. Este estudo avaliou o desenvolvimento da pele reconstruída glicada e posteriormente, a avaliação da eficácia e toxicidade de compostos anti-glicação como aminoguanidina e carnosina em modelo de pele reconstruída glicada. Em perspectiva, este estudo contribuiu para o desenvolvimento de uma nova tecnologia *in vitro*, a pele reconstruída glicada, que auxiliará a compreensão da biologia da interação célula-MEC mimetizando processos fisiopatológicos importantes como o envelhecimento e o DM.

**Palavras chave:** *Pele Humana Reconstruída; Produtos Finais de Glicação Avançada; Envelhecimento da Pele; Diabetes Mellitus; Métodos Alternativos para Substituição Animal.*

## ABSTRACT

PENNACCHI, P. C. Development of Reconstructed Human Skin containing Glycated Dermal Equivalent to Toxicity and Efficacy Tests of anti-glycation Compounds. 2015. 170f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The Advanced Glycation End Products (AGEs) of proteins is a common factor to the pathophysiology of a number of disorders related to aging and diseases such as diabetes mellitus (DM). The generation of the AGEs products on skin occurs mainly through non-enzymatic glycation reactions of the dermal extracellular matrix and has been touted as one of the factors responsible for loss of elasticity and disability of skin healing. The skin permeation of compounds is an important limitation for therapeutic/cosmetic efficacy of anti-AGE compounds, which must reach the deepest layers of the skin. Reconstructed skin model containing dermal equivalent modified by *in vitro* glycation is able to mimic the elderly human skin and represent an efficient model for the study of cells interactions and changes in extracellular matrix induced by aging and diabetes. The 3D reconstructed skin model has metabolic characteristics, permeability and activity similar to the original skin, reinforcing its role in drug permeability of investigations toxicity, irritation, safety and efficacy evaluation of compounds and differentiation of keratinocytes. A number of natural or synthetic AGEs inhibitor compounds have been recently discovered and displayed and can represent therapeutic innovation for the treatment of changes caused by the aging of the skin. In this study we performed the development of reconstructed glycated skin model and evaluated the efficacy and toxicity of anti-glycation compounds such as aminoguanidine and carnosine. In perspective, this study has contributed to the development of a new technology *in vitro*, and for the understanding cell-extracellular matrix interaction during the aging of skin.

**Key words:** *Reconstructed Human Skin; Advanced Glycation End Products; Skin Aging; Diabetes Mellitus; Alternative Methods for Animal Replacement.*

## 1. INTRODUÇÃO

A glicação não enzimática das proteínas é um fator comum para a fisiopatologia de uma série de transtornos relacionados ao envelhecimento e à doenças como o Diabetes mellitus (DM). O DM é um problema importante de saúde pública mundial, devido à morbidade e ao alto índice de mortalidade causada principalmente por complicações a longo prazo como a insuficiência renal, doenças cardiovasculares e distúrbios neurológicos. A hiperglicemia persistente, característica da doença, pode levar a glicação proteica e a auto-oxidação da glicose que tem como consequência o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês: *Reactive Oxygen Species*), formação dos produtos de glicação avançada, entre outros efeitos. Porém, o dano induzido pela glicação não é limitado ao diabetes e, mesmo em níveis glicêmicos normais, algum grau de glicação ocorre levando ao acúmulo lento e progressivo dos danos.

Estudos de Dyer e colegas (1993) demonstraram que em indivíduos idosos, a glicação não enzimática será elevada, não exclusivamente em indivíduos hiperglicêmicos, mas condições em normoglicêmicas devido à exposição à glicose em longo prazo. AGEs como, por exemplo, a pentosidina e a carboximetilisina, considerados biomarcadores do envelhecimento, têm sido descritos em níveis de concentração aumentados em cerca de cinco vezes quando comparamos indivíduos jovens e idosos (Dyer et al, 1993).

Desta forma, este trabalho foi proposto com o objetivo de gerar a pele humana reconstruída *in vitro* (PHR) modificada pela glicação das proteínas, biomimetizando os processos fisiopatológicos do envelhecimento e do diabetes para, posteriormente, avaliar a ação dos AGEs neste tecido e a eficácia de compostos anti-AGEs neste modelo, descrevendo as alterações moleculares, celulares e estruturais na PHR glicada.



A revisão da literatura que se segue apresenta os principais tópicos que auxiliam a compreensão do nosso trabalho.

### 1.1 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

Os AGEs constituem uma variedade de substâncias formadas a partir de interações entre açúcares redutores, como a glicose e a frutose, ou lipídeos oxidados com proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (Hori et al, 2012). Trabalhos anteriores demonstraram que os AGEs desempenham um importante papel no desenvolvimento das complicações do DM. Neste processo, a molécula de glicose pode ligar-se a estrutura de proteínas, através de uma reação não enzimática denominada reação de Maillard ou glicação. A glicação é uma modificação pós-transducional de proteínas que resulta da reação entre um aldeído (açúcar, ribose, frutose) e aminas livres de aminoácidos (lisina, arginina) da proteína, alterando sua estrutura e função (Hori et al, 2012). Esse processo se divide em três estágios: inicial, intermediário e final (**Figura 1**).

No estágio inicial a glicose ou outros açúcares redutores (frutose, pentoses, galactose, manose, ascorbato e xilose) reagem com radicais amina presentes em várias moléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios formando uma Base Schiff, instável. Esta por sua vez, passa por um rearranjo gerando cetoaminas estáveis, conhecidas como “Produto de Amadori”, que são conhecidos marcadores de glicação no estágio inicial como, por exemplo, a frutoselisina. As principais variáveis que regulam a formação destes compostos são as concentrações de glicose circulante, a meia vida da proteína, sua reatividade em termos de grupamentos amina livres e a permeabilidade celular à glicose. Estes produtos iniciais possuem grupos carbonilas reativos e, através de ligações irreversíveis, podem acumular-se em proteínas de meia vida curta e longa. A

hemoglobina glicada e as frutosaminas são conhecidos exemplos de “Produtos de Amadori” (Lapolla et al, 2004). No estágio intermediário, os produtos de Amadori passam por reações de oxidação e desidratação levando a formação de compostos contendo dicarbonila, como o glioxal, metil glioxal e as 3-deoxiglicosonas. Estes produtos intermediários são mais reativos que seus precursores e atuam propagando reações com grupos amina livres de proteínas. Em particular o metil glioxal, um alfa-oxaldeído, que é um dos compostos propagadores mais importantes *in vivo*, tanto pela sua alta reatividade como pela sua elevada concentração plasmática (Thornalley, 1996). No estágio final, estes propagadores podem interagir com grupamentos amina e através de reações de oxidação, desidratação e ciclização, formando compostos insolúveis e irreversíveis, e em alguns casos, auto-fluorescentes, denominados Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs), que se acumulam nas proteínas de forma estável e levam a lesões tissulares. Outro mecanismo pelo qual os AGEs podem ser formados envolve a auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e metais livres levando à formação de compostos carbonila, que interagem com proteínas e formam cetoaminas altamente reativas (Lapolla, Traudi & Fedele, 2004).

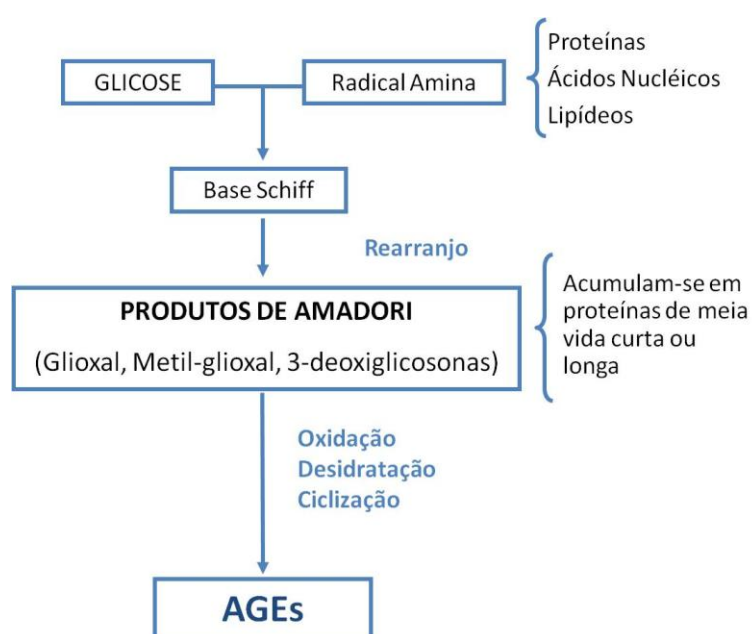


Figura 1. Esquema da formação dos AGEs.  
Fonte: do autor.

Centenas de AGEs têm sido descritos como, por exemplo, a Ne-carboximetil-lisina (CML), AGE mais abundante no soro sanguíneo humano (Ikeda et al, 1996), Ne-carboxietil-lisina (CEL), pirralina, dímeros de lisina derivados do glioxal (GOLD), dímeros de lisina derivados do metil glioxal (MOLD), dímeros de lisina derivados da 3-deoxiglicose (DOLD), AFGP (1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol), FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-Himidazol), pentosidina e argpirimidina (Schleicher et al. 2001; Ahmaed et al, 2002; Kikuchi et al, 2003). Vários AGEs exibem uma autofluorescência característica, com comprimentos de onda de excitação de 370 nm e emissão de 440 nm. Alguns deles, como a pentosidina, exibem autofluorescência em outros comprimentos de onda (excitação 328 nm e emissão 378 nm) (Nagai et al, 2010). A **Tabela 1** mostra as principais estruturas dos AGEs classificadas por sua capacidade de apresentar fluorescência.

Tabela 1: Exemplos de AGEs separados conforme sua característica de autofluorescência.

AGEs não-autofluorescentes	AGEs auto-fluorescentes
CML – Carboximetil-lisina	Pentosidina
CEL – Carboxietil-lisina	Crossline
Pirralina	Fluorolink
Arg-Pirimidina	Pirropiridina
MG-Imidazolonas (derivados de Metilglioxal)	Vesperlisina A
3DG-Imidazolonas (derivados de 3-deoxiglicose)	Vesperlisina B
	Vesperlisina C
	MRX
	GOLD (Dímero de Lisina derivado de Glioxal)
	MOLD (Dímero de Lisina derivado de Metilglioxal)
	FFI (Fluoril-furanil-imidazol)

Fonte: do autor.

A mensuração de produtos de glicação no soro ou nos tecidos de diabéticos é utilizada para avaliar o risco de progressão do DM. Os dois parâmetros mais utilizados são a avaliação da hemoglobina glicada (HbA1c) e das proteínas glicadas do soro, ou frutossaminas (Lapolla, Traudi & Fedele, 2004). A avaliação do controle metabólico no DM pode ser realizada estimando-se a extensão da exposição do organismo à glicose, através da determinação dos produtos de glicação.

Outros produtos intermediários da glicação que também podem ser estimados em laboratório são glioxal, metil-glioxal e deoxiglicosonas. Estudos de Lapolla, Traudi e Fedele (2004) demonstraram um aumento na concentração de metil-glioxal nos rins, olhos e plasma de animais diabéticos quando comparados aos animais saudáveis. Este aumento ocorreu de forma proporcional aos níveis glicêmicos observados.

A formação dos AGEs através da hiperglicemia crônica contribui para complicações do diabetes. Eles parecem exercer importante papel na patogênese da cardiomiopatia. O aumento da formação de AGEs associados ao colágeno gera rigidez miocárdica seguida de fibrose já que modificam a estrutura das proteínas, principalmente do colágeno, afetando suas funções (Brownlee et al, 1988; Norton et al, 1996).

A caracterização estrutural de grande parte dos AGEs já foi realizada e um grande número destes compostos está disponível comercialmente em sua forma sintética (PolyPeptide Group<sup>®</sup> - San Diego, CA, USA) e já vem sendo testados em modelos de envelhecimento de pele *in vitro* (Pageon et al, 2015). Níveis elevados de alguns AGEs, como a pentosidina, têm sido detectados no plasma, hemácias e urina de pacientes e esta elevação tem sido correlacionada com a idade e DM. Além disso, existe uma relação linear entre os níveis de pentosidina e a gravidade das complicações micro e macro angiopáticas. Altos níveis de CML também vêm sendo descritos em pacientes diabéticos e associados à retinopatia e nefropatia, o que se deve ao processo de glicação associado à peroxidação lipídica (Lapolla et al, 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que os AGEs têm um papel essencial na patogênese da nefropatia diabética e na progressão da insuficiência renal. As complicações do envelhecimento normal, como perda da função renal, doença de

Alzheimer, alterações de pele e cataratas, podem também ser mediadas pela glicação progressiva das proteínas de vida longa (Raj et al, 2000).

A ligação de AGEs às proteínas pode alterar a estrutura e função biológica de macromoléculas tais como lipoproteínas, imunoglobulinas, entre outras. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ligadas ao colágeno glicado não são reconhecidas pelos receptores específicos para LDL, favorecendo sua captação por receptores inespecíficos e consequente formação de células espumosas, sendo ainda capazes de estimular a liberação de tromboxano  $\beta_2$  e de induzir agregação plaquetária, além de gerar radicais livres com consequente aumento de lesões oxidativas (Yonekura, 2003). Finalmente, estas lipoproteínas com estrutura alterada estimulam a liberação de anticorpos levando a formação de complexos imunes que se depositam nas paredes dos vasos (Bernerd et al, 2000). Todos estes mecanismos podem contribuir para a oclusão dos vasos e justificam a ocorrência de macroangiopatia no paciente diabético. Além disso, é sabido que imunoglobulinas ligadas ao colágeno têm uma capacidade diminuída de formar complexos antígeno-anticorpo (Yonekura, 2003). Sabe-se também que a atividade dos neutrófilos polimorfonucleares está modificada em indivíduos diabéticos apresentando uma diminuição da quimiotaxia, aderência, fagocitose e capacidade de destruição intracelular, o que diminui a capacidade imunológica e a resposta inflamatória desses pacientes (Alves et al, 2007).

Dados da literatura têm demonstrado a existência de receptores celulares específicos para AGEs. Estes receptores foram identificados em diferentes células, tais como, linfócitos T, monócitos/macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa, neurônios, células vermelhas e mesangiais. Entre os diferentes receptores de AGEs, o receptor denominado RAGE é provavelmente a molécula melhor caracterizada, além dos RAGEs, receptores como AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3 também são capazes de

reconhecer e ligar-se a AGEs e suas ações se relacionam à depuração e detoxificação desses compostos. Quanto à glicação intracelular, sabe-se que os AGEs formados podem interagir com nucleotídeos, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição do DNA celular e alterar propriedades importantes para a homeostase celular (Yonekura, 2003).

Sendo assim, os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas tendo participação em diversas comorbidades, com destaque para o DM, a aterosclerose, a insuficiência renal, a doença de Alzheimer e o processo natural de envelhecimento que correlaciona-se à alteração dos processos inflamatórios, em fenômeno conhecido como “inflamaging” (Ahmed et al, 1997; Li & Dickson, 1997; Paul & Bayley, 1996).

## 1.2 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* é definido como uma síndrome de hiperglicemia crônica resultante da deficiência na produção de insulina e/ou de resistência à ação deste hormônio. A classificação do DM inclui: DM tipo 1 (também chamado insulino-dependente, geralmente surge durante a infância ou pré-adolescência), DM tipo 2 (adquirido ao longo da vida, geralmente associado aos hábitos alimentares e ao sedentarismo, além de fatores genéticos), DM gestacional (geralmente representado por um aumento transitório da resistência à ação da insulina pelos tecidos), DM associado a outras doenças (ou secundário), DM associado ao uso de fármacos específicos, entre outros tipos (American Diabetes Association, 2011).

No DM ocorrem alterações fisiológicas que diminuem a capacidade imunológica e a resposta inflamatória dos pacientes, aumentando a susceptibilidade às infecções

(Hotamisligil, 2006) e a prevalência das infecções cutâneas associadas ao DM é geralmente aumentada em comparação com a população normal. De acordo com Perez e Kohn (1994) as manifestações cutâneas do DM podem ser classificadas em 4 subcategorias: 1) Doenças de pele associadas forte ou fracamente com a doença (necrobiose lipoídica, dermatopatia diabética, pele amarelada, xantomas eruptivos, desordens perfurantes, *Acanthosis nigricans* e leucoplasias orais). 2) Infecções (fúngicas e bacterianas). 3) Manifestações cutâneas das complicações do diabetes (microangiopatias, macroangiopatias e neuropatias). 4) reações cutâneas decorrentes do tratamento do diabetes com o uso de sulfonilureias ou insulina (Braverman, 1971; Sibbald & Schachter, 1984; Huntley, 1982).

Os AGEs formados podem lesar as células por diferentes mecanismos, tais como a formação de ligações cruzadas com macromoléculas, interação com receptores celulares específicos e glicação intracelular. Proteínas glicadas induzem toxicidade através de sua ligação aos receptores de AGEs (RAGEs), e esses efeitos são particularmente prejudiciais nas doenças diretamente relacionadas com a glicação, como o DM, a arteriosclerose, a osteoporose e a doença de Alzheimer (Nagai et al, 2010). A formação de ligações cruzadas com o colágeno justifica a ocorrência de várias complicações crônicas observadas no envelhecimento e DM como rigidez vascular e espessamento de membranas basais e pode inibir a liberação de óxido nítrico derivado do endotélio, com conseqüente vasoconstrição, redução do fluxo plasmático e isquemia tissular (Ikeda et al, 1998; Yonekura, 2003).

O grau de controle glicêmico no DM está diretamente envolvido na patogênese das alterações fisiológicas como a diminuição da capacidade imunológica e resposta inflamatória dos indivíduos acometidos (Hotamisligil, 2006). Entre as alterações descritas estão as disfunções nos leucócitos como anormalidades na aderência, quimiotaxia,

fagocitose e destruição intracelular. Há diminuição, também, da ativação espontânea e da resposta neutrofílica, se comparadas aos indivíduos não diabéticos (Kempf et al, 2006; Ferreira et al, 2012). Simultaneamente, uma queda na resposta dos polimorfonucleares (PMN) a estímulos diversos pode ser responsável pela elevada incidência de infecção bacteriana em diabéticos (Grykiel et al, 2000).

A cicatrização normal de feridas é uma importante sequência de eventos que envolvem migração de células para o local da ferida, inflamação, proliferação de diferentes tipos celulares, angiogênese, formação de componentes de matriz, remodelamento e finalmente o fechamento da ferida. A resposta inflamatória frente à injúria é essencial para a rápida cicatrização das feridas. Danos à cicatrização de feridas em pacientes diabéticos são motivo de grande preocupação clínica, uma das principais causas de hospitalizações e causa de um grande número de amputações, sendo a maior de causa morbidade nestes pacientes, muitas vezes levando a dor, sofrimento e baixa qualidade de vida. Estima-se que ulcerações do pé diabético (**Figura 2**) ocorram em 15% dos pacientes (Reiber et al, 1999) e precedam 84% de todas as amputações relacionadas à doença (Reiber et al, 1995).



Figura 2. Ferida em pé diabético. Fonte: Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação.



### 1.3 ENVELHECIMENTO DE PELE

Todos os organismos têm uma longevidade potencial ou fisiológica, que é a idade máxima em que podem viver em condições ideais, sem estresse ou doenças e em que a morte ocorra exclusivamente devido ao envelhecimento ou senescência. O envelhecimento cronológico é descrito como um processo biológico tempo-dependente que leva a alterações graduais na estrutura e função de todos os tecidos que compõe o organismo. O envelhecimento de pele resulta de fatores intrínsecos e extrínsecos como, por exemplo, o foto-envelhecimento causado pela exposição à radiação solar. (Asselineau et al, 2003, Poon et al, 2015). Essas alterações tendem a diminuir a capacidade de resposta adaptativa e cicatrização de feridas na pele, aumentando, portanto a suscetibilidade à doenças e à morte (Mine et al, 2008). O envelhecimento da pele é caracterizado pelo achatamento da junção derme-epiderme, uma proeminente atrofia e perda de elasticidade dos tecidos conectivos dérmicos (Montagna et al, 1979), associados à redução e desorganização dos principais componentes de MEC, como por exemplo o colágeno e outras fibras elásticas (Lavker et al, 1987), proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Carrino et al, 2003).

Sabe-se que a radiação ultravioleta (UV) é responsável por 80 a 90% dos danos gerados na pele envelhecida (Ichihashi et al, 2011), a indução das ROS gerada pela radiação UV age como catalisadora na geração dos AGEs (Hori et al, 2012).

Os AGEs são um fator comum na patofisiologia de grande número de desordens relacionadas ao envelhecimento (Nagai et al, 2010; Suji & Divakam, 2004). A glicação das proteínas têm sido amplamente discutida, bem como seus efeitos na pele (Hofmann et al, 2013) e em órgãos como rins, vasos sanguíneos e córnea (Crisan et al, 2013). O processo de glicação está envolvido não somente nos processos intrínsecos do envelhecimento (individual e/ou genético), mas também por processos extrínsecos

(radiação ultravioleta, poluição e estilo de vida) e pode ser quantificada nos compartimentos dérmico e epidérmico através de técnicas histológicas, imunohistoquímicas, de imageamento “*in loco*” e ensaios fluorimétricos (Pageon et al, 2008; Crisan et al, 2012, Pennacchi et al, 2015).

Durante o envelhecimento cutâneo a glicação afeta as células (fibroblastos, células endoteliais, entre outras) e também as proteínas (colágeno, elastina, glicoproteínas, e glicosaminoglicanos) (Crisan et al, 2013). A glicação da MEC no compartimento dérmico afeta o crescimento, diferenciação e motilidade de fibroblastos, células predominantes nesta região, respostas inflamatórias por alteração na liberação de citocinas, atividade enzimática (metaloproteinases) e hemostase vascular (Pageon et al 2008, Pennacchi et al, 2015).

Estudos sobre a contribuição da glicação de proteínas na fisiopatologia de algumas doenças têm focado principalmente na sua relação com o diabetes e suas complicações, porém o dano induzido pela glicação não é limitado ao diabetes. Mesmo em níveis normais de glicose, algum grau de glicação ocorre, e os danos decorrentes se acumulam lentamente ao longo do tempo.

No caso clínico exemplificado na **Figura 3**, observamos um caso clássico de fotoenvelhecimento cutâneo causado pela exposição à radiação solar. Neste exemplo o indivíduo relata ter sido exposto à radiação solar principalmente em sua hemiface esquerda, devido à sua ocupação, motorista (The New England Journal of Medicine, 2015). Crisan e colegas (2013) demonstraram o acúmulo de AGEs na MEC, nos fibroblastos e nas células endoteliais durante o envelhecimento, este fenômeno foi amplificado pela ação da radiação UV devido à geração das ROS, induzindo a formação do precursor de AGEs, o glioxal, no epitélio (Kovacs et al, 2009).

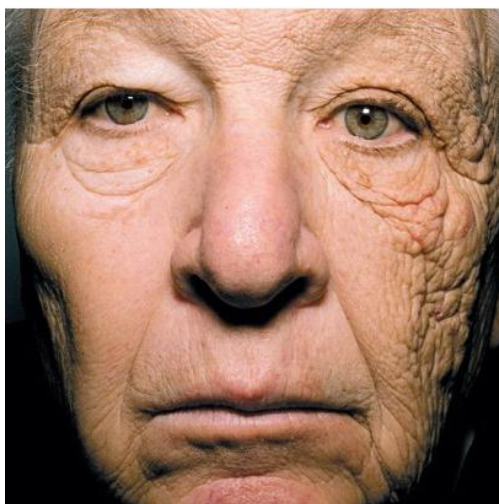


Figura 3. Envelhecimento cutâneo observado após exposição prolongada à radiação ultravioleta.  
Fonte: The New England Journal of Medicine.

Em indivíduos idosos, a glicação não enzimática das proteínas é elevada, devido não somente à possível hiperglicemia frequente nesses indivíduos, mas também devido à exposição prolongada às condições normoglicêmicas. Produtos finais de glicação avançada como pentosidina e carboximetilisina (CML), considerados biomarcadores do envelhecimento, têm demonstrado aumentar sua concentração nos fluidos e tecidos corporais em cinco vezes desde a infância até a velhice (Dyer et al, 1993).

Sabe-se que o acúmulo de AGEs ocorre de forma mais lenta ao longo do envelhecimento biológico se comparado ao DM. Mas há estudos que demonstram uma intolerância à glicose respectiva a idade em seres humanos, meso sem que o quadro de DM seja estabelecido. Em indivíduos normais, há um ligeiro aumento da glicemia de jejum relacionado à idade bem como um atraso no retorno ao normal depois de um teste oral de tolerância à glicose. Uma explicação para isso é a redução na sensibilidade à insulina pelos tecidos com a idade. Evidências sugerem que o envelhecimento aumenta a resistência à insulina principalmente devido a mudanças na transdução de sinal no receptor de insulina e mudanças no número desses receptores. Não se pode ignorar o

papel desempenhado pelos AGEs e estresse oxidativo neste processo (Fulop, Larbi & Douziech, 2003).

A pele envelhecida possui alterações notórias na epiderme e derme, tais como degradação do tecido conjuntivo, diminuição de colágeno e acúmulo de tecido elástico anormal (Bernerd & Asselineau, 1998; Bernerd, Vioux & Asselineau, 2000). Quanto aos efeitos dos AGEs na pele, sabe-se que sua geração ocorre em um nível significativo em proteínas constituintes como o colágeno, a elastina e proteoglicanas como o ácido hialurônico, que retém fluidos mantendo a hidratação da pele (Hori et al, 2012). O colágeno e a elastina são proteínas de meia vida longa, sua taxa de renovação é de aproximadamente 15 anos. A retenção dessas proteínas por períodos tão prolongados no organismo às expõe ao processo de glicação mesmo nas condições normoglicêmicas (Verzijl et al, 2000). Sabe-se que a MEC dérmica em condições normais provê resistência e maleabilidade à pele, ela consiste principalmente de fibras de colágeno tipo I, produzido pelos fibroblastos. A ligação entre os fibroblastos e as fibras colagênicas gera forças mecânicas capazes de regular a morfologia e função celular. No envelhecimento a degradação enzimática (Fischer et al, 2002) ou mudança de conformação do colágeno causada pela glicação reduz essas forças mecânicas, resultando em perda de fibroblastos em número e função, o que acarreta na deficiência na produção de colágeno (Quan et al, 2013). A glicação do colágeno e da elastina gera danos graves à elasticidade do tecido devido ao *cross-link* entre as fibras colagênicas (Bailey 2001).

Na epiderme o acúmulo dos AGEs, como a CML, leva ao aumento dos níveis da queratina glicada, principalmente a citoqueratina-10, o que reduz a flexibilidade da pele e, especialmente no estrato córneo o acúmulo de CML causando rugosidades, e levando à uma aparência amorfa, opacidade e perda de firmeza (Pageon & Asselineau, 2005;

Dunn et al, 1991; Kawabata et al, 2011; Ichifashi et al, 2011; Pennacchi et al, 2015). Por este motivo o estudo dos efeitos da glicação de pele é importante tanto em pacientes diabéticos quanto em indivíduos idosos.

Equivalentes de pele *in vitro* são um eficiente modelo para o estudo de células e modificações provocadas na MEC no processo de envelhecimento. Em um estudo de Pagoon e Asselineau (2005) compararam a morfologia de pele reconstruída contendo colágeno nativo ou modificado por glicação *in vitro*, os autores observaram uma redução da espessura cutânea na amostra glicada. Além disso, o sistema se mostrou promissor para se observar os efeitos do envelhecimento sobre os elementos da MEC e para avaliar a eficácia de inibidores da formação dos AGEs (Pagoon & Asselineau, 2005; Pennacchi et al, 2015) demonstrados neste trabalho.

#### 1.4 PELE HUMANA RECONSTRUÍDA *IN VITRO*

A pele humana é o maior órgão do corpo humano e age como uma barreira contra as agressões externas (Ravichandran et al, 2012; Groeber et al, 2011). Ela também previne desidratação e constitui barreira física limitando penetração de agentes potencialmente danosos ao organismo (Yildrimer et al, 2012).

A pele humana é organizada em uma elaborada estrutura composta por três camadas ou estratos: a epiderme, a derme e a hipoderme (Hori et al, 2012). A epiderme é o estrato mais superficial, avascular, composto principalmente pelos queratinócitos, além de outros tipos celulares como as células de Langerhans e melanócitos (Böttcher-Haberzeth et al, 2010, Brohem et al, 2011). A epiderme é subdividida em quatro estratos que se formam através da diferenciação dos queratinócitos, estes se distribuem da região mais interna para a mais externa conforme seu estágio de maturação (Hori et al, 2012), o estrato basal é o mais interno e proliferativo, fica em contato com a membrana

basal que separa epiderme de derme. O estrato espinhoso fica acima do basal, e é gerado através de mitoses assimétricas das células mais basais, não seguem o ciclo celular normal e crescem em tamanho de citoplasma, estabelecendo uma robusta conexão intercelular. O terceiro estrato é o granuloso, neste estrato as células se organizam e se alinham, formando um envelope impermeável à água, devido ao acúmulo de grânulos lipídicos, ao redor da membrana plasmática (Brohem et al, 2011). O estrato mais externo é o estrato córneo, que se caracteriza pela liberação de enzimas lisossomais que degrada a maior parte das organelas dos queratinócitos, tornando-os totalmente escamosos e anucleados, e fortemente conectados de forma a estabelecer a barreira cutânea (Simpson et al, 2011). A camada dérmica situa-se logo abaixo da epiderme e é responsável pela elasticidade e integração mecânica da pele, contém a MEC vascularizada, rica em colágeno do tipo I, elastina e glicosaminoglicanos (Pereira et al, 2013), o tipo celular predominante são os fibroblastos, mas contém também células endoteliais, fibras musculares, mastócitos entre outros (Pereira et al, 2013). É na derme que se localizam os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, vasos sanguíneos e linfáticos (Brohem et al, 2011), além de corpúsculos e terminações nervosas. A terceira e mais profunda camada da pele é a hipoderme, localizada abaixo da derme, é composta principalmente por tecido adiposo e colágeno e age como isolante térmico e reserva energética (Yildrimer et al, 2012).

Como as células que compõem o tecido da pele humana crescem em uma organização em três dimensões (3D), o padrão de cultura de células em monocamada (2D) não representa bem a arquitetura fisiológica da pele. Vários tipos de pele humana recombinante, também chamada pele reconstruída, fornecem essa estrutura 3D e já foram confeccionados *in vitro*. Esses modelos de peles organotípicas podem ser

utilizados em diferentes aplicações, incluindo substituição à experimentação animal para testes de segurança e eficácia de compostos (Brohem et al, 2011).

As interações entre uma célula individual, as células vizinhas imediatas e a MEC são responsáveis pelo controle do comportamento celular (Grinnell 1976; Bissell, Hall & Parry, 1982; Yang et al, 1987; Lin & Bissel, 1993; Smalley, Lioni & Herlyn, 2006; Grinnell, 2008). Portanto, as células cultivadas em monocamadas 2D não conseguem capturar a complexidade do microambiente *in vivo* (Mazzolenni, Di Lorenzo & Steinerberg, 2009). Têm-se sugerido, por exemplo, que as células cultivadas em substratos 2D tais como placas de cultura, perdem uma infinidade de sinais importantes, chaves regulatórias e fenótipo tecidual. Células cultivadas em 3D têm expressão diferenciada de receptores de superfície celular, capacidade proliferativa, síntese de MEC, densidade de células e funções metabólicas particulares que dificilmente são mantidas no ambiente 2D (Grinnell, 1976; Bissell, Hall & Parry, 1982; Yang et al, 1987; Lin & Bissell, 1993; Smalley, Lioni & Herlyn, 2006; Grinnell, 2008; Mazzolenni, Di Lorenzo & Steimberg, 2009; Horning, 2008). Assim, modelos de monocamada 2D não perdem apenas na reprodução e complexidade de ambientes *in vivo*, mas também podem levar a falsos resultados ao forçar as células a se adaptarem a uma superfície artificial, plana e rígida. Um número crescente de estudos relatam diferenças no fenótipo, sinalização, migração celular e respostas de drogas quando as mesmas células são cultivadas em condições de cultura 2D ou 3D, nos quais é descrito inclusive um efeito protetores a alguns tipos celulares contra o efeito de drogas, quando essas células encontram-se imersas em um microambiente tridimensional em contato com outros tipos celulares (Mazzolenni, Di Lorenzo & Steinerberg, 2009, Tiago et al, 2014). Estudos *in vitro* demonstraram que fibroblastos dérmicos secretam fatores solúveis que se difundem na epiderme subjacente e podem influenciar os queratinócitos a induzir a produção de proteínas na

membrana basal ou fatores melanogênicos (Balasubramani, Kumar & Babu, 2001; El Ghalbzouri et al, 2002; Wong et al, 2007).

Queratinócitos em monocultivo produzem apenas uma fina camada epidérmica e, sem apoio mesenquimal, sofrem apoptose após cerca de duas semanas em cultura (Wong et al, 2007). Sua cocultura com fibroblastos dérmicos promovem não só a proliferação dos queratinócitos, mas também o desenvolvimento de estratos de diferenciação identificáveis. Conseqüentemente epitélios devidamente estratificados não se formam numa simples cultura monocamada 2D. Só em avançados sistemas 3D *in vitro* os queratinócitos desenvolvem epitélios bem ordenados oferecendo assim uma oportunidade mais próxima de reconstruir a pele humana (El Ghalbzouri et al, 2002; Wong, McGrath & Navasaria, 2007; Stark et al, 2004, Brohem et al, 2011, Pennacchi et al, 2015).

Modelos que recapitulam a arquitetura básica da pele humana possibilitam o estudo de interações célula a célula, efeitos do ambiente estromal na regulação da proliferação melanogênica e diferenciação dos queratinócitos, bem como processos de reepitelização após ferimentos. Esses métodos são empregados para diversos fins em pesquisa, como estudos da biologia da pele, farmacotoxicologia, estudos da biologia celular e molecular, e possuem propriedades biológicas e farmacológicas semelhantes à pele humana nativa, promovem cicatrização de feridas, agindo como barreira às infecções e perda de líquidos em pacientes vítimas de queimaduras, por exemplo (Jean et al, 2011). São considerados os mais avançados substitutos de uso clínico no recobrimento temporário de feridas, com potencial de promover regeneração dérmica e epidérmica reestabelecendo a estrutura normal da pele (Groeber et al, 2011). Estudos de Mazlyzam e colegas (2007) avaliaram a utilização de modelo de equivalente de pele humana utilizado como implante no dorso de camundongos imunossuprimidos (*Nude*) na



regeneração da pele após ensaio de ferida. Os resultados demonstraram que esse tipo de substituto foi capaz de regenerar a área afetada com a formação da junção derme-epidérmica semelhante à pele nativa (Mazlyzam et al, 2007).

Sabe-se que os equivalentes de pele atuais são deficientes no que diz respeito à vascularização e formação de apêndices como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (Groeber et al, 2011; Böttcher-Haberzeth et al, 2010). Apesar disso, estes modelos de pele são extremamente relevantes para testes de potenciais agentes anti foto-envelhecimento, criação de modelos de estudo do câncer, bem como um excelente sistema para análises farmacológicas e cosmetológicas, representando alternativas atuais e de favorável custo-benefício para a substituição do uso animal para esses tipos de testes (Brohem et al, 2011, Pennacchi et al, 2015).

## 1.5 APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Atualmente vivemos um momento científico de importância mundial ao que se refere ao desenvolvimento e/ou melhoria de métodos alternativos ao uso de animais na pesquisa. Desde 2009 a União Europeia incentiva o desenvolvimento de alternativas ao uso animal em indústrias cosmetológicas e desde 2013 baniu totalmente a comercialização de qualquer agente cosmético testado em animais. No Brasil uma lei estadual e outra federal determinaram, a partir de 2014, a proibição completa do uso de animais para testes de produtos acabados nas indústrias cosmetológica, química e farmacêutica, sempre que os componentes da fórmula já tiverem sido considerados seguros para o uso humano pela ANVISA, o banimento destes testes para moléculas novas entrará em vigor no prazo de 5 anos à partir da validação de uma metodologia alternativa.

Na cadeia produtiva da farmacologia, a descoberta de um fármaco é dependente da capacidade preditiva de ensaios pré-clínicos, geralmente com base em cultura de células (Mazzolenni et al, 2009). Porém, grandes diferenças são observadas quando os mesmos medicamentos são testados *in vivo*. Esta diferença *in vitro* versus *in vivo* pode resultar de diferentes receptores de superfície celular, cinética de proliferação, componentes da MEC, densidades celulares e funções metabólicas alteradas nas células em monocamada (Horning et al, 2008).

A permeação de fármacos pela pele também é uma limitação importante para compostos que devem agir nas camadas mais profundas da pele (Régnier et al, 1993; Godin & Touitou, 2007). Pele de cadáveres foi utilizada no passado para estudos de transporte de fármacos, mas havia limitações na disponibilidade de amostras e grande variação entre os espécimes, gerando pouca confiabilidade e reprodutibilidade dos testes e aumentando o potencial de aplicação de modelos de pele reconstruída (Pasonen-Seppänen et al, 2001).

O modelo 3D de pele reconstruída tem características metabólicas, de permeabilidade e atividade semelhantes à da pele nativa, potencializando seu papel nas investigações sobre permeabilidade de fármacos, toxicidade, irritação e diferenciação dos queratinócitos (Régnier et al, 1993; Pasonen-Seppänen et al, 2001; Godin & Touitou, 2007; Brohem et al, 2011). Uma das preocupações em relação ao modelo de pele reconstruída é a sua deficiência de apêndices, incluindo folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas. Por essas razões, este modelo proporciona propriedades de barreira inferior à encontrada na pele. Consequentemente, enquanto o modelo de pele reconstruída é superior ao modelo monocamada, os parâmetros cinéticos de permeabilidade obtidos a partir desses estudos ainda devem ser considerados uma superestimativa se comparados ao fluxo através da pele humana

(Brohem et al, 2011). Sabe-se também que a morfologia da pele reconstruída modificada pela glicação, apesar de semelhante à pele reconstruída não-glicada, apresenta estrutura fibrilar alterada, além de modificações biológicas e morfológicas que refletem envelhecimento *in vivo* e podem estar relacionadas à glicação por si só (Pageon et al, 2007, Pennacchi et al, 2015).

## 1.6 COMPOSTOS ANTI-GLICAÇÃO

Uma série de compostos naturais ou sintéticos inibidores de AGEs têm sido propostos, descobertos ou apresentados recentemente. Uma revisão recente de Nenna e colegas (2015), descreveu os principais anti-AGEs descritos em artigos científicos nos últimos anos (**Tabela 2**).

O mecanismo de ação dos anti-AGEs se dá pela inibição da glicação “pré-Amadori” ou “pós-Amadori” (*breakings*). Os inibidores “pré-Amadori” agem prevenindo a estabilização dos AGEs pelo bloqueio das etapas iniciais da reação de Maillard. Já os inibidores “pós-Amadori” seriam capazes de impedir que os produtos intermediários da glicação, os produtos de Amadori, se estabilizem através de novas reações para a forma estável e irreversível, os AGEs e, portanto, poderiam ter uso terapêutico no tratamento de doenças causadas pela glicação das proteínas (Rahbar et al, 2000).

Tabela 2. Compostos anti-AGEs

<b>Composto</b>	<b>Mecanismo de ação Anti-AGEs</b>
<b>Aminoguanidina</b>	Inibidor “pós-Amadori” aprisiona intermediários dicarbonílicos, inibidor de óxido nítrico sintase
<b>Piridoxamina (Vitamina B6)</b>	Previne a transformação dos intermediários proteína-Amadori em proteína-AGEs, age como inibidor “pós-Amadori” pelo aprisionamento dos intermediários dicarbonílicos
<b>Benfotiamina (Vitamina B1)</b>	Inibidor “pós-Amadori” pelo aprisionamento dos intermediários dicarbonílicos
<b>ACEIs</b>	Inibidor “pré-Amadori” e “pós-Amadori”, quelante de íons metálicos de transição
<b>ARBs</b>	Agonista de PPAR $\gamma$

<b>Estatinas</b>	Estimulam depuração de RAGEs
<b>Alagebrium (ALT-711)</b>	Quebra ligações carbono-carbono (disruptor de AGEs)
<b>TZDs</b>	Agonista de PPAR $\gamma$ , reduz a expressão de RAGE
<b>ALT-946*</b>	Inibidor “pós-Amadori” aprisiona intermediários dicarbonílicos, inibidor de NOS
<b>OPB-9195*</b>	Inibidor “pós-Amadori” aprisiona intermediários dicarbonílicos, agonista de PPAR $\gamma$
<b>Tenilsetam*</b>	Inibidor “pós-Amadori” aprisiona intermediários dicarbonílicos, quelante de íons metálicos de transição
<b>LR-90*</b>	Inibidor “pós-Amadori” aprisiona intermediários dicarbonílicos, quelante de íons metálicos de transição
<b>TM2002*</b>	Quelante de íons metálicos de transição
<b>sRAGE*</b>	Previne a ligação dos AGEs aos RAGEs
<b>PEDF*</b>	Inibidor da protease serina que reduz a transdução de sinal AGE-RAGE, ativa a transdução de sinal de PPAR $\gamma$
<b>Carnosina</b>	Quelante de metais e antioxidante

Abreviações: ACEIs: Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina (do inglês: *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors*). ARBs: Bloqueador do receptor de angiotensina (do inglês: *Angiotensin Receptor Blockers*). NOS: Óxido Nítrico Sintase (do inglês: *Nitric Oxide Synthase*). TZDs: Tiazolidinedionas. \*Nenhum dado em humanos foi publicado até o momento (4 de maio de 2015).

Fonte: adaptado de Nenna e colaboradores, *Res Cardiovasc Med*, 2015.

A fim de validar nosso modelo de glicação do gel de colágeno tipo I, realizamos a incubação conjunta com inibidores clássicos da glicação das proteínas. Optamos por utilizar a aminoguanidina (AG), um inibidor clássico de AGEs e a Carnosina (CA), um antioxidante utilizado em formulações cosméticas. A AG é uma pequena molécula de hidrazina que age como uma “armadilha” para reativos carbonílicos intermediários da formação dos AGEs tais como metilgloxal (MgO), gloxal (GO), e 3-deoxiglicosona (3-DG) (Lewis & Harding, 1990; Hirsch, Baines & Feather, 1992; Thornalley & Yurek-George, 2000), AG inibe também a formação de carboximetilisina (CML) e carboxietilisina (CEL), conhecidos produtos finais da glicação e demonstrou ser um potente inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Corbett et al, 1992). A AG foi primeiro composto a ser extensivamente estudado *in vitro* e *in vivo* como sendo um

potente inibidor da formação de AGEs (Brownlee et al, 1986). A AG tem demonstrado inibir a glicação de várias proteínas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hori et al, 2012). Há estudos mostrando o papel da AG na inibição da formação de ligações cruzadas e fluorescência de colágeno de aorta de ratos diabéticos e vários pesquisadores demonstraram que ela retarda o desenvolvimento de complicações diabéticas, incluindo nefropatia, neuropatia e vasculopatia (Brownlee, 1994). No entanto a revisão de Nenna e colaboradores (2015) demonstra que a AG não apresenta, de forma geral, efeitos benéficos na progressão de nefropatia declarada em humanos, e mostrou apenas uma modesta atenuação de complicações no paciente portadores de DM e desceve ainda que os estudos em humanos foram interrompidos devido à falta de eficácia e preocupações com segurança, principalmente devido à hepatotoxicidade observada (Nenna et al, 2015).

Outro inibidor de AGEs que testamos em nossos experimentos foi a carnosina (CA) ( $\beta$ -alanil-L-histidina), já que este composto é um dos mais utilizados em formulações cosméticas comerciais como um inibidor do envelhecimento causado pela glicação. A CA é um dipeptídeo natural amplamente distribuído nos tecidos de mamíferos, incluindo músculos e cérebro, em altas concentrações. Várias funções biológicas, incluindo seu papel como quelante de metais e antioxidante fizeram da carnosina um inibidor AGEs interessante para estudos *in vitro* e *in vivo*, a molécula age como “scavenging” de radicais livres e foi demonstrado que ela é capaz de estender o tempo de vida de fibroblastos humanos em cultivo (McFarland & Holliday, 1994 e 1999), matar células transformadas, proteger as células contra os aldeídos e fragmentos amilóides de peptídeos e inibir, *in vitro*, a glicação de proteínas (formação de ligações cruzadas, grupos carbonila e AGEs) e ligações cruzadas DNA/proteína (Hipkiss, 1998), além de reduzir as concentrações de ácido tiobarbitúrico (TBARS) quando adicionado

aos lipídeos previamente oxidados (Boldyrev et al, 1988; Aruom, Laughton & Halliwell, 1989; Aldini et al, 2002). Estudos demonstram que em um indivíduo de 70 anos os níveis de CA nos tecidos apresentam-se até 63% menores do que em indivíduos jovens (Hipkiss, 1998 e 1994).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo central deste trabalho foi desenvolver a pele reconstruída modificada pela glicação do compartimento dérmico a fim de reproduzir uma pele diabética e/ou envelhecida com a proposta de criar uma plataforma de avaliação *in vitro* de compostos anti-glicação e anti-envelhecimento.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Isolar melanócitos, queratinócitos e fibroblastos humanos isolados a partir de fragmentos de pele cedidas por pacientes submetidos à cirurgias reparadoras.
2. Avaliar o perfil citotóxico das moléculas aminoguanidina e carnosina às células da pele humana.
3. Desenvolver o processo de glicação do colágeno tipo I *in vitro*.
4. Padronizar e avaliar morfológicamente as peles reconstruídas glicadas em comparação com as peles não glicadas (controles).
5. Avaliar as moléculas anti-glicantes aminoguanidina e carnosina quanto à eficácia na inibição da glicação *in vitro* no colágeno tipo I.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares*

O banco de células do laboratório de Patologia e Citologia Clínica contém melanócitos, queratinócitos e fibroblastos humanos isolados no próprio laboratório conforme será descrito mais adiante. As células são cultivadas em incubadora de cultura celular a 37°C, em frascos plásticos descartáveis contendo meio de crescimento normal específico para cada linhagem utilizada, em atmosfera de CO<sub>2</sub> adequada para a manutenção de pH próximo ao fisiológico e especificado abaixo.

As culturas de queratinócitos são mantidas em atmosfera de 7,5% de CO<sub>2</sub>, em meio KGM Gold BulletKit (Lonza, Allendale, NJ, USA), suplementado com KGM-Gold SingleQuot Kit e acrescido de isoproterenol 10<sup>-6</sup> molar (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Os melanócitos são mantidos com meio comercial específico para este tipo celular, previamente suplementado (M254 Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os fibroblastos são mantidos em meio D-MEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/ml de ampicilina e 100 µg/ml de estreptomicina - Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As culturas celulares de fibroblastos e melanócitos são mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células são subcultivadas sempre que atingem, aproximadamente, 80% da densidade de saturação, utilizando, para tanto, tripsina 0,1% em PBS (tampão fosfato salino contendo 1mM EDTA - ácido etileno diamino tetra-acético), ou tripsina 0,05% para melanócitos, sempre com lavagem prévia utilizando o mesmo tampão. Os estoques celulares são mantidos em meio de cultivo contendo 8% do criopreservador DMSO (dimetilsulfóxido - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) a -196°C, em nitrogênio líquido (Tiago et al, 2014; Pennacchi et al, 2015).

### 3.2 Isolamento Celular

Os três tipos celulares predominantes da pele humana: fibroblastos, queratinócitos e melanócitos, foram obtidos à partir de pele de prepúcio recebidos como doação de pacientes submetidos á postectomia no Hospital Universitário da USP, com anuência dos comitês de ética locais (CEP-HU/USP: 943/09 CAAE: 0062.0.198.000-09 e CEP/FCF/USP: P/CEP/FCF/534), as imagens representativas do

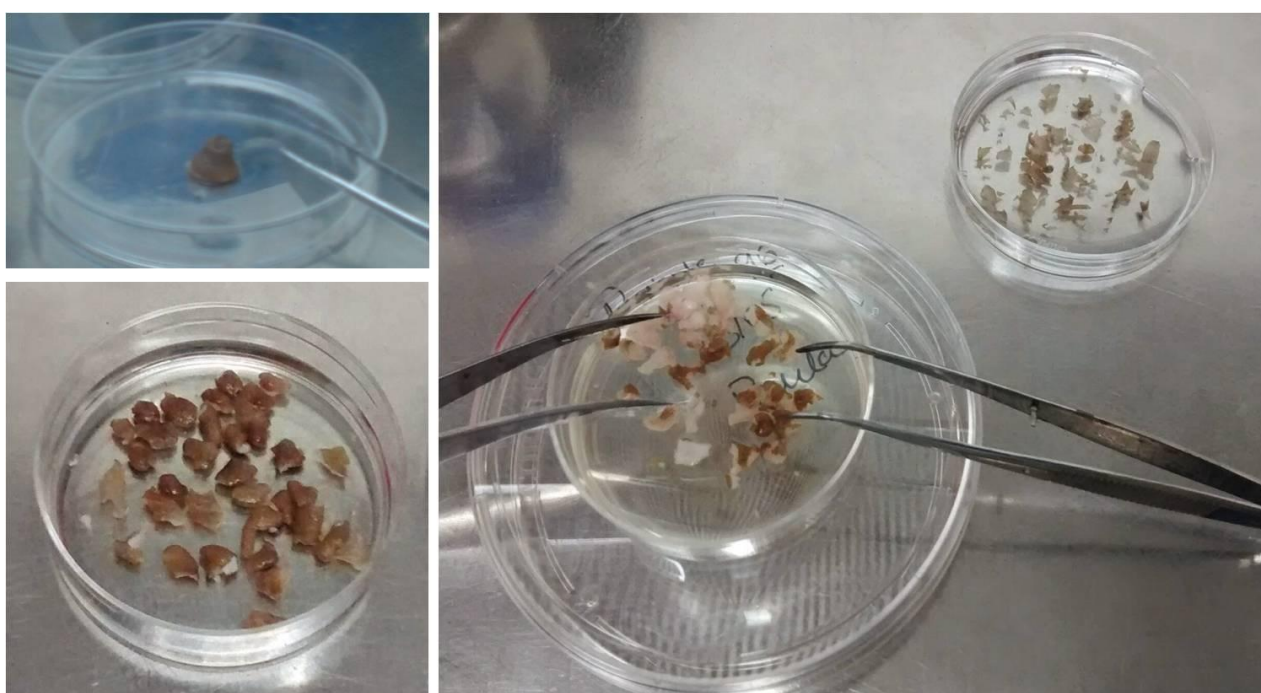


Figura 4. Isolamento de células à partir de pele humana. À esquerda, em cima: pele de prepúcio. À esquerda em baixo: fragmentação do tecido após limpeza e esterilização. À direita: separação mecânica de derme e epiderme. Fonte: do autor.

processo de isolamento estão dispostas na **Figura 4**.

As amostras de pele obtidas através de cirurgia de postectomia em bebês ou crianças (até aproximadamente 15 anos de idade) foram recebidas em frascos identificados contendo solução fisiológica. Estes frascos foram mantidos em geladeira (4°C) até o momento do processamento, o que ocorria preferencialmente no mesmo dia



da cirurgia. Algumas amostras recebidas foram consideradas inadequadas ou inviáveis devido à degradação do tecido por contaminação, provavelmente causada pelo mau armazenamento da amostra no hospital. Amostras consideradas adequadas passaram por uma etapa de esterilização rápida com banho em etanol 70%, seguido de 03 banhos em tampão PBS contendo ampicilina e estreptomicina (100 µg/ml e 100 U/ml, respectivamente, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O tecido adiposo e os vasos sanguíneos foram removidos com auxílio de tesoura e pinça estéreis. Após a limpeza inicial o tecido foi fragmentado em porções de aproximadamente 9 mm<sup>2</sup> e incubados em uma solução de dispase II a 4 mg/ml (neutral protease, grade II, obtida de *Bacillus polymyxa*, Roche) em PBS contendo antibióticos, por 12 horas a 4°C, com a porção dérmica voltada para o fundo da placa (60 mm) e a porção epidérmica voltada para cima. A função da dispase é clivar o colágeno tipo IV que predomina na região da membrana basal da pele, porção que delimita a junção entre derme e epiderme (Waaajman et al, 2010), desta forma, após a digestão enzimática da membrana basal, paramos a reação com adição de soro fetal bovino e destacamos as porções dérmica e epidérmica com auxílio de pinças estéreis, realizando assim a primeira etapa para o isolamento dos 3 tipos celulares predominantes na pele humana.

A derme é então incubada em uma solução de colagenase I 1 mg/ml (obtida de *Clostridium histoyticum* 180,00 unidades/mg, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em PBS com antibióticos por 2 horas à 37°C, após este período a ação da colagenase é parada pela adição de meio DMEM contendo SFB, as células são centrifugadas por 3 minutos a 1500 rpm e ressuspensas e plaquedas em meio DMEM contendo 10 % de SFB.

A epiderme é incubada em solução de trispsina (0,05 %) preparada como descrito anteriormente, por 15 minutos à 37°C. Passado o período de incubação da epiderme,

esta é agitada fortemente 3 vezes para desagregação celular, a ação da tripsina é bloqueada pela adição de meio DMEM contendo 10% de SFB, a suspensão celular é filtrada em *cell strainer* com poro de 100  $\mu$ M e centrifugada por 3 minutos à 1500g. O *pellet* das células da epiderme é ressuspenso em meio para cultivo de queratinócitos em placas de cultura celular de diâmetro de 100 mm previamente recobertas por colágeno IV, conforme anteriormente descrito. Essa cultura é mantida em incubadora a 7,5% de CO<sub>2</sub>, 37°C por 6 horas para adesão celular (queratinócitos e melanócitos), passado esse período, o meio de cultura é trocado para remoção de células mortas.

Após cerca de uma semana de proliferação (aproximadamente 60% confluência), os melanócitos são removidos do cocultivo com queratinócitos através de tripsinização seriada da seguinte forma. Primeiramente realizamos uma tripsinização rápida com tripsina (0,05 %) por 2 minutos à temperatura ambiente, o que promove a desagregação dos melanócitos, o *pellet* é ressuspenso em meio de cultivo específico para esse tipo celular e a cultura é mantida em incubadora contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Realizamos então uma segunda tripsinização (tripsina 0,1% por 3 minutos à 37°C) na qual coletamos parte dos queratinócitos e alguns melanócitos remanescentes, essas células são plaqueadas e identificadas para que novo isolamento seja realizado posteriormente, então uma terceira tripsinização é feita, com tripsina 0,1% por 3 a 4 minutos a 37°C, de forma a coletar todos os queratinócitos que ainda permaneceram aderidos, essas células são plaqueadas como cultura pura de queratinócitos, e mantidas em meio específico à 7,5% de CO<sub>2</sub>.

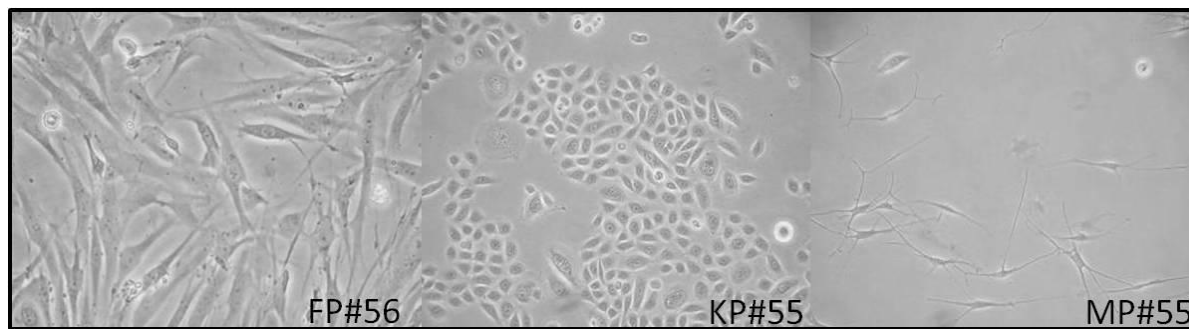


Figura 5. Fotomicrografia representativa das culturas de células de pele isoladas a partir de prepúcio

FP#56 P1: fibroblastos humanos isolados a partir de doação de pele do paciente nº 56.

KP#55 P2: queratinócitos humanos isolados a partir de doação de pele do paciente nº 55.

MP#55 P1: melanócitos humanos isolados a partir de doação de pele do paciente nº 55.

Fonte: do autor

As culturas ultra-puras (**Figura 5**) foram então expandidas para ampliação do banco das células do laboratório, e utilizadas para os experimentos que se seguem (adaptado de Brohem et al, 2011).

### 3.3 *Cultivo de queratinócitos: adequação de protocolo*

A fim de aperfeiçoar o protocolo de manutenção dos queratinócitos humanos, visando aumentar o rendimento e qualidade das culturas, testamos um protocolo que estimulasse maior adesão celular no momento do descongelamento ou plaqueamento dos queratinócitos, para tanto, preparamos um recobrimento (*coating*) de colágeno tipo IV nas placas de cultivo. Sabe-se que diversas culturas de células ancoragem-dependentes derivadas de tecidos e órgãos humanos têm obtido maior sucesso quando cultivadas sobre superfícies recobertas por MEC quando comparadas àquelas cultivadas sobre plástico (Yashiki et al, 2001; Freshney et al, 2010).

Para isto, utilizamos colágeno tipo IV (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na concentração final de 0,03 mg/ml em meio de cultura DMEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), aplicado como um filme sobre as placas ou garrafas de cultura.

Como forma de avaliar a eficácia do método geramos uma curva de crescimentos de queratinócitos cultivados em placas com ou sem o “*coating*” de colágeno. Para tanto, preparamos previamente placas de cultura (35 milímetros de diâmetro) com ou sem o “*coating*” de colágeno tipo IV, plaqueamos queratinócitos humanos na densidade  $10^4$  células por placa. Nos tempos de 3, 5 e 7 dias registramos o crescimento das colônias celulares, características de queratinócitos, através de fotomicrografias e por contagem pelo método de Azul de Tripán. Observamos que o revestimento com colágeno favoreceu a adesão e aumentou em aproximadamente 3 vezes a proliferação celular após uma semana em cultura (dados não mostrados).

Além disso, testes realizados pelo laboratório demonstraram que a suplementação extra do meio comercial de cultivo de queratinócitos KGM (Lonza, Allendale, NJ, USA) com o isoproterenol ( $10^{-6}$  M) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), um agonista beta-adrenérgico estruturalmente semelhante à adrenalina, melhorou significativamente a qualidade das células, tornando-as mais proliferativas, o que foi observado pela análise do tempo de crescimento das culturas. Por esta razão alteramos o protocolo de manutenção de queratinócitos humanos até então seguido pelo laboratório incluindo o prévio revestimento das placas sempre que as células são descongeladas e/ou plaqueadas e incluímos o isoproterenol ao meio de cultivo para este tipo celular.

Além destas alterações de protocolo, passamos também a analisar as células obtidas no isolamento celular à partir de pele de prepúcio, à análise quanto às possíveis contaminações por agentes infecciosos por PCR. Isso é importante para garantir a pureza e qualidade das culturas, e para garantir a segurança ao manipulador, já que não são realizados testes sorológicos prévios nos pacientes submetidos à postectomia no Hospital Universitário. Para tanto, coletamos o sobrenadante e o pellet de células

utilizadas na confecção das peles reconstruídas para extração de RNA por meio do kit de extração de RNA viral (Pure link® Viral RNA/DNA Mini Kit, Invitrogen). As amostras de RNA foram então encaminhadas para análise na Universidade Estadual de Maringá/PR pela equipe coordenada pela Professora Doutora Márcia Edilaine Lopes Consolaro. Foram realizados testes para detecção de material genético proveniente de microorganismos responsáveis por 07 doenças sexualmente transmissíveis: *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Herpes virus simplex* (HSV-1 e HSV-2); *Mycoplasma genitalium*; *Trichomonas vaginalis*; *Neisseria gonorrhoeae* e pesquisa para presença do *Papiloma vírus humano*, o HPV. Como controle positivo da qualidade do RNA extraído pesquisou-se a presença de fragmento correspondente à B-globina. A pesquisa para todos os microorganismos e HPV resultou negativa para todas as amostras testadas conforme **Figuras 6 e 7** abaixo. Atualmente, todas as culturas primárias isoladas pelo nosso grupo, bem como as células já armazenadas no banco de células primárias do Laboratório de Citopatologia são avaliadas quanto à contaminação por esses microorganismos, entre outros (Citomegalovírus, Hepatite B, HTLV-1, HTLV-2, HIV-1 e Hepatite C).

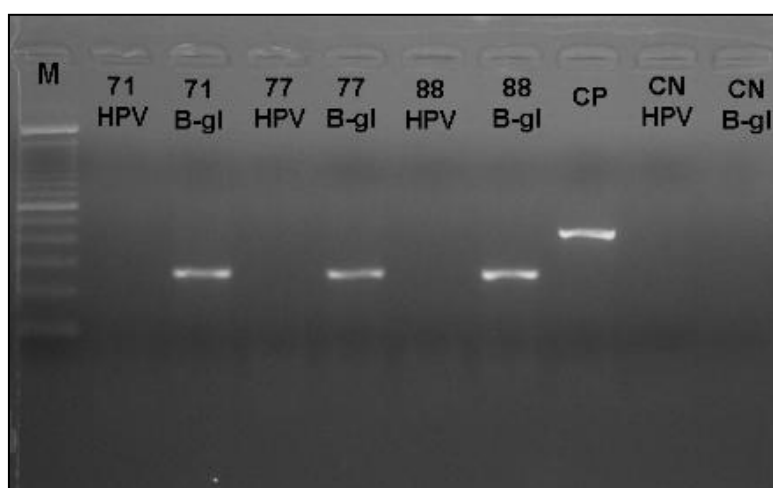


Figura 6. Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para detecção de HPV por PCR em gel de agarose 1,5%. M: marcador de 100pb

CP: controle positivo de HPV;

CN HPV: controle negativo de HPV;  
 CN B-gl: controle negativo B-globina.  
 71 HPV: amostra 71 análise de HPV;  
 71 B-gl: amostra 71 análise de B-globina;  
 77 HPV: amostra 77 (pool pacientes 77, 78 e 79) análise de HPV;  
 77 B-gl: amostra 77 (pool pacientes 77, 78 e 79) análise de B-globina;  
 88 HPV: amostra 88 análise de HPV;  
 88 B-gl: amostra 88, análise de B-globina.

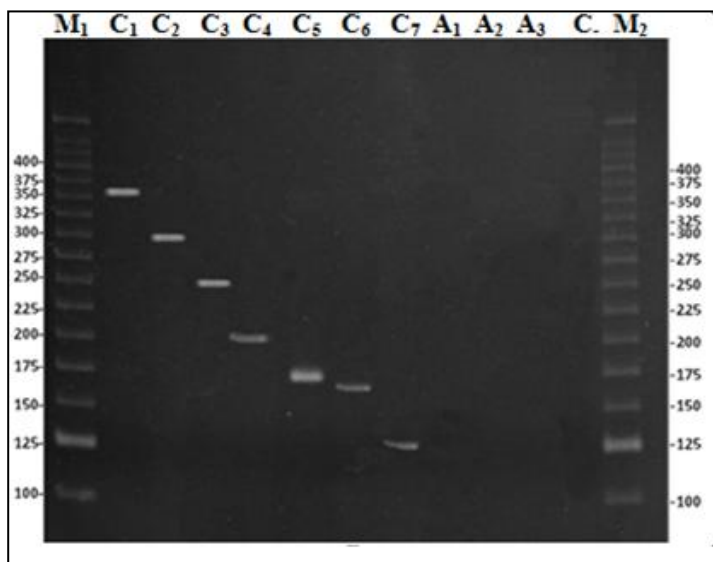


Figura 7. Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para sete microrganismos usando PCR multiplex em gel de poliacrilamida 8%. Todas as amostras foram negativas

C1: controle de *Chlamydia trachomatis* (361 pb);  
 C2: controle de *Treponema pallidum* (291 pb);  
 C3: controle de HSV-2 (249 pb);  
 C4: controle de *Mycoplasma genitalium* (193 pb);  
 C5: controle de *Trichomonas vaginalis* (170 pb);  
 C6: controle de *Neisseria gonorrhoeae* (162 pb);  
 C7: controle de HSV-1 (123 pb).  
 As amostras 71, 77 (pool 77, 78 e 79) e 88 estão representadas por A1, A2 e A3, respectivamente.  
 M1 e M2, marcador de tamanho molecular (25bp Invitrogen).

### 3.4 **Ensaio de citotoxicidade dos compostos anti-glicação**

Para avaliar as moléculas aminoguanidina e carnosina quanto ao seu perfil citotóxico foi realizado o Ensaio de Viabilidade Celular de fibroblastos através do corante de exclusão Azul de Tripán.

Foram testadas as concentrações de 10, 15, 20, 25 ou 30 mM de aminoguanidina ou carnosina sobre fibroblastos, células predominantes da derme, expostas diretamente aos compostos aplicados na matriz de colágeno no momento da pré-glicação.

Os ensaios das diferentes concentrações dos dois compostos foram realizados em três diferentes períodos de exposição: 24, 48 ou 72 horas. Os fibroblastos foram cultivados em placas de 24 poços ( $5 \times 10^4$  células por poço) e mantidos em contato com os compostos nas diferentes concentrações e períodos de exposição. Após o período de exposição o sobrenadante foi coletado, as células foram lavadas com PBS e removidas da placa por meio da ação da enzima tripsina 0,1% em incubação durante 3 minutos em estufa 37 °C, a ação da enzima foi parada pela adição de meio de cultura contendo soro fetal bovino a 10% e a suspensão celular foi também coletada em tubo cônico. A placa foi novamente lavada com PBS a fim de coletar todas as células restantes e a suspensão foi coletada nos tubos correspondentes que foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 30 µl de meio de cultura e 30 µl solução de azul de tripan para contagem em Câmara de Neubauer (Tennant, 1964, Tiago et al, 2014).

### 3.5 *Obtenção de colágeno tipo I*

Para a obtenção de colágeno tipo 1 foram utilizadas caudas de ratos jovens, adultos ou diabéticos, a extração do colágeno das fibras se deu através de digestão ácida conforme protocolo adaptado de Maria & Wada (1996) da seguinte maneira. Caudas de ratos *Wistar*, doadas pelo Laboratório de Bioquímica Clínica, coordenado pela Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues (UNIFAL-MG, Alfenas-MG), mantidas congeladas a -20°C até o momento dos experimentos, foram dessecadas a fim de expor os tendões. As fibras foram retiradas com auxílio de pinças do tipo dente de rato. E postas para secar por 24 horas à temperatura ambiente. Após secas, as fibras foram pesadas e lavadas em etanol 70% para esterilização. A partir desta etapa todo o procedimento foi realizado de forma estéril em fluxo laminar. As fibras foram solubilizadas em ácido

acético 0,5 N sob agitação a 4 °C por 48 horas, após esse período foi realizada uma centrifugação a 4 °C, 5000 g por 90 minutos para purificação, o *pellet* foi desprezado e a proteína foi lavada em solução de NaCl 20%, seguida de nova centrifugação a 4 °C, 5000 g por 90 minutos. A fase aquosa foi então descartada e o colágeno foi dialisado contra água destilada estéril, por 48 horas sob agitação à 4 °C, e armazenado em frascos estéreis a 4 °C até o momento do uso.

Alternativamente utilizamos colágeno tipo 1 comercial (Corning Collagen I, Rat Tail, 100mg, #354236, Corning, NY, USA).

### 3.6 *Desenvolvimento do processo de Glicação “in vitro” de colágeno tipo I*

Durante a padronização do processo de pré-glicação do colágeno tipo 1 comercial, a fim de mimetizar processo de envelhecimento de pele ou o Diabetes Mellitus, realizamos testes para três diferentes formas de glicação, duas rápidas (24 h) e uma lenta (4 semanas) a fim de encontrarmos o processo mais adequado aos nossos experimentos. O protocolo para cada tipo de glicação *in vitro* foi descrito abaixo.

Como primeira forma de glicação *in vitro* utilizamos o ácido glioxílico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) como agente glicante, conforme experimentos de Liao e colegas (2009). Matrizes de colágeno (50 mg) foram incubadas por 24 horas a 37°C, sob agitação leve, em solução de ácido glioxílico (0,715g) e cianoborohidreto de sódio (1,42g) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) que age como catalisador da reação, diluídos em PBS (pH7.2, 25ml), e filtrados em poro de 0,2 micrômetros para manutenção das condições estéreis.

Alternativamente seguimos o protocolo de glicação descrito por Alikhani e colegas (2006), utilizando como agente glicante o glioxilato de sódio (0,715g) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e cianoborohidreto de sódio como catalisador (1,42g)



previamente solubilizados em PBS (pH 7.2, 25 ml) e filtrados em poro de 0,2 micrômetros, por 24h a 37°C, sob agitação leve.

O terceiro protocolo testado foi o de Paeon e colegas (2008), que representa uma glicação lenta e progressiva e com a incubação das matrizes do colágeno com ribose 10mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), previamente solubilizada em PBS e filtrada em poro 0,2 micrômetros, por quatro semanas à temperatura ambiente sob agitação.

Matrizes de colágeno foram incubadas somente com cianoborohidreto de sódio em PBS (catalisador das glicações rápidas) ou somente com PBS (veículo da glicação lenta) e foram utilizadas como controle de glicação.

Como tratamentos, incubamos o colágeno com os diferentes agentes glicantes na presença dos inibidores da glicação Aminoguanidina ou Carnosina, nas concentrações de 10, 15, 20 25 ou 30 mM, reproduzindo, e ampliando, o ranking de concentrações descrito na literatura para estes dois compostos (Paeon et al, 2008; Alhamdani et al, 2007). Após os diferentes tratamentos, as amostras foram dialisadas contra água destilada por 48 horas sob agitação à 4 °C. Todo o processo foi realizado em ambiente estéril.

### 3.7 *Mensuração da glicação de colágeno tipo 1 por Fluorimetria*

O grau de glicação do colágeno comercial incubado com os agentes glicantes, ou obtido do tendão da cauda de ratos, foi monitorada de através de análise da emissão de luz intrínseca (sem adição de fluoróforos) após serem excitados em determinados comprimentos de onda conforme descrito por Paeon e colegas (2007).

Realizamos duas medidas em comprimentos de onda distintos a fim de estimar a presença de AGEs autofluorescentes e, de uma forma mais específica, a Pentosidina,

AGE composto pelos resíduos de arginina e lisina em *crosslink* com uma pentose, o mais representativo AGE dentre aqueles que emitem autofluorescência (Gkogkolou & Böhm, 2012). O experimento se deu da seguinte forma: uma alíquota do colágeno (nas diferentes condições) foi solubilizada pela digestão com pepsina 200 µg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) em ácido acético 0,5M a 37°C *overnight* sob agitação. Ao final da incubação, o pH do material digerido foi ajustado para 7.0 pela adição NaOH (0,5N), as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante contendo colágeno digerido foi utilizado para a aferição da emissão de fluorescência em espectrofotômetro, em placas de 96 poços com as laterais pretas e fundo translúcido, a fim de diminuir a perda de sinal. Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação de 370 nm e emissão de 440 nm para a detecção de AGEs totais, e excitação de 328 nm e emissão de 378 nm para detecção de pentosidina.

### 3.8 *Geração de pele humana reconstruída contendo equivalente dérmico glicado*

O equivalente dérmico foi obtido mediante a mistura de fibroblastos ( $15 \times 10^4$  células/derme) ressuspensos em SFB (50µl/derme) com o colágeno tipo I (2,5mg/ml) reconstituído, ou seja, com pH corrigido pela adição de meio Ham's F12 10X concentrado (100µl/derme, Gibco Life Technologies, MD,USA) e um volume igual de tampão de reconstituição (2,2% NaHCO<sub>3</sub>, NaOH 0,05M, HEPES 200mM) em gelo. No caso dos equivalentes gerados com os colágenos glicados "*in vitro*" ou tratados com aminoguanidina ou carnosina, utilizamos em proporção 1:1 com colágeno comercial a fim de garantir a polimerização. Mesmo nesta diluição, os AGEs presentes na mistura ainda apresentaram capacidade de geração de autofluorescência significativa, como será demonstrado mais adiante.

Os equivalentes de derme, até então em solução (colágeno + fibroblastos) foram transferidos para placas de 24 poços (0,8ml/poço), mantidos a 37°C por 30 minutos para gelificação do colágeno. Após esse período foi adicionado 1ml de meio de RAFT (preparado conforme tabela abaixo) por poço para normalização do pH, a placa foi mantida por cerca de 2 horas à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até a adição de queratinócitos primários humanos (Pennacchi et al, 2015).

Queratinócitos e melanócitos humanos sub-confluentes foram usados para a reconstrução da epiderme. Após normalização do pH das dermes, removemos o meio de RAFT que recobria os equivalentes de derme em cada poço foram colocados  $25 \times 10^4$  queratinócitos e  $0.83 \times 10^4$  melanócitos. Após a adesão destas células por aproximadamente 24h, submersas em meio RAFT e meio para queratinócitos na proporção 1:1 à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, a montagem foi transferida para uma grade de metal previamente esterilizada que garantiu a manutenção da interface ar-líquido, a pele foi então cultivada utilizando meio de RAFT por duas semanas para a diferenciação da epiderme (Pennacchi et al, 2015).

O meio de RAFT, utilizado para a manutenção das peles é preparado no laboratório e é composto pelos meios comerciais DMEM e Ham-F12 na proporção de 3:1, respectivamente, além de 10% de SFB e suplementos, conforme descrito na **Tabela 3** abaixo:

Tabela 3: Suplementos utilizados no preparo do meio RAFT.

Reagente	Concentração
Toxina Colérica	10,1 nM
Insulina	5 µg/ml
Apo-Transferrina	5 µg/ml
Hidrocortisona-21 hemisuccinate	0,4 µg/ml
Epidermal Growth Factor	0,5 ng/ml

### 3.9 *Avaliação morfológica da pele artificial glicada*

Após a confecção das peles, essas foram fixadas com formalina tamponada 10% a 4°C overnight, desidratadas em série crescente de alcoóis e embebidas em parafina histológica no Setor de Técnicas Histológicas do ICB-USP. Os blocos foram cortados em secções de 5µm em micrótomo e as lâminas foram submetidas à coloração Hematoxilina & Eosina para análise morfológica em microscópio óptico (Tiago et al, 2014, Pennacchi et al, 2015).

### 3.10 *Análise da pele reconstruída glicada por Microscopia Confocal Multifóton*

A fim de estudar a modulação da trama das fibras de colágeno tipo I frente à glicação, as lâminas histológicas geradas pelos cortes das peles incluídas em parafina histológica foram analisados através da Microscopia Confocal Multifotônica, utilizando Microscópio Zeiss LSM 780 system (Carl Zeiss, Jena, Germany) no núcleo de instalações de apoio à pesquisa (CEFAP - Centro de Facilidades para Pesquisa, ICB-USP). As imagens foram adquiridas através de objetiva de 20x e analisadas pelo software Zen (Carl Zeiss, Jena, Germany). Com este tipo de microscopia é possível realizar a leitura do material de forma tridimensional, em profundidade, devido à capacidade de penetração das ondas de excitação no comprimento infravermelho (Bélisle et al, 2010). Além disso, devido à baixa carga energética das ondas nessa região do espectro, a microscopia multifóton apresenta pouco esmaecimento ("*photobleaching*") do tecido e é pouco fototóxica às células analisadas, possibilitando também análise a fresco do tecido (Koehler et al, 2006). Um dos recursos da microscopia multifotônica é a técnica de microscopia por geração de luz em segundo harmônico (SHG – do inglês: *second harmonic generation*), que utiliza espalhamento não-linear de fótons causado pela trama assimétrica do colágeno para recriar sua

imagem. Isto é feito sem a necessidade de corantes, apenas pela resolução gerada pela reflexão das fibras (Fine & Hansen, 1971; Freund & Deutsch, 1986). A microscopia por SHG funciona como uma sonda óptica de alta seletividade e excelente contraste de imagem para análise de colágeno, e a imagem por SHG resulta da tripla-hélice não centro-simétrica das três cadeias polipeptídicas da molécula de colágeno (Tanaka et al, 2013).

Existe também a possibilidade da análise de colágeno através da excitação da sua autofluorescência em determinados comprimentos de onda. Embora feixes de colágeno de pele *in vivo* não exibam resposta fluorescente à excitação devido ao seu arranjo espacial diferenciado, amostras de colágeno purificado emitem fluorescência no comprimento de onda do ultravioleta (de 100 a 400nm) (Jiang et al, 2011). Após a confecção das lâminas e coloração de rotina com Hematoxilina & Eosina as mesmas lâminas foram utilizadas para análise por microscopia por SHG, sem a necessidade de nenhum tratamento especial.

### 3.11 *Análise matemática da alteração das fibras colagênicas pela glicação*

Após obtidas as imagens por SHG, contamos com a colaboração da equipe do Professor Doutor Luciano Fontoura da Costa, do Departamento de Física e Informática da USP- São Carlos-SP, para a análise matemática da alteração de padrão de arranjo das fibras colagênicas das peles reconstruídas glicadas.

Utilizando os dados das imagens dos grupos experimentais: peles controles; peles glicadas ou peles tratadas com aminoguanidina, aplicou-se o conceito de coeficiente de variação, que possui a capacidade de quantificar variações de intensidade de cor em uma dada região da imagem. O procedimento para o cálculo do coeficiente de variação baseia-se na premissa de que para cada pixel “i” da imagem, armazena-se a

intensidade de cor dos pixels a uma distância (raio) menor que “r” do pixel “i”. Em seguida foram calculadas a média,  $\mu_r(i)$ , e o desvio padrão,  $\sigma_r(i)$ , da intensidade de cor desses pixels, que são então utilizados para medir o coeficiente de variação, definido por:

$$cvr(i) = \frac{\sigma_r(i)}{\mu_r(i)}$$

O valor do raio “r” define a escala na qual a variação de intensidade de cor é medida ao redor de cada ponto da imagem. Para caracterização das imagens, foram selecionados aleatoriamente 200 pontos da imagem e calculados o coeficiente de variação desses pontos para 8 raios distintos (no intervalo [2, 30 pixels]). O objetivo foi verificar se os conjuntos de pontos selecionados para cada imagem possui coeficiente de variação distinto. Como para cada ponto, há 8 medidas (igual ao número de diferentes raios utilizados), utilizou-se o método conhecido como análise de componentes principais (PCA), para análise dos resultados.

### 3.12 *Avaliação imunohistoquímica da pele artificial glicada*

Após a avaliação morfológica das peles pela coloração Hematoxilina & Eosina e pela microscopia multifotônica, as peles foram analisadas frente aos marcadores de diferenciação celular, anticorpo anti-Queratina 10 reativo à região de epitélio estratificado e altamente diferenciado e anticorpo anti-Queratina 14 reativo à camada basal de proliferação e estratificação do epitélio. Além disso, investigamos a geração da Carboximetil-lisina (CML), produto de glicação amplamente descrito dentre os AGEs e capaz de se ligar à citoqueratina 10 no epitélio, utilizando o anticorpo anti-CML. Além disso investigamos também a presença dos marcadores de adesão célula-célula E-caderina e Desmogleína, as proteínas vinculina e alfa-SMA (Brohem et al, 2011; Pigeon et al, 2008; Pennacchi et al 2015). O protocolo experimental está descrito a seguir.

Os cortes de pele foram previamente desidratados e embebidos em parafina histológica no Setor de Técnicas Histológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, ICB I – USP foram realizados cortes em microtomia (5µm de espessura) e estes cortes foram aderidos às lâminas silanizadas e mantidos por 3 horas em estufa a 60°C para remoção do excesso de parafina, depois as lâminas foram diafanizadas em 2 banhos em xilol 100% por 15 minutos cada, e hidratadas em série decrescente de graduação alcoólica (3 banhos em etanol 100%, 1 banho em etanol 95%, 1 banho em etanol 70%, 1 banho em etanol 50% e 2 banhos em água destilada, sendo cada banho na duração de 5 minutos).

Foi feita então a recuperação antigênica através da incubação das lâminas em tampão citrato pH 6,0 por 5 minutos a 95°C, duas vezes. Após o resfriamento do tampão as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos, duas vezes. Em seguida foi realizada a inativação da peroxidase endógena pela incubação das lâminas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em água destilada, 3 vezes de 10 minutos cada.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito pela incubação das amostras em PBS + 2% de soro fetal bovino (SFB), à temperatura ambiente por 1 hora em câmara úmida.

Para as marcações, as amostras foram incubadas com os anticorpos específicos diluídos na solução de PBS conforme **Tabela 4** abaixo, overnight a 4°C em câmara úmida.

Tabela 4. Diluições dos anticorpos primários utilizados nas imunomarcações

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Marca/Código</b>	<b>Diluição</b>
Anti-citoqueratina 10 monoclonal (VIK-10)	Abcam/ab1421	1:150
Anti-citoqueratina 14 monoclonal (LL002)	Abcam/ab7800	1:150
Anti-CML monoclonal (CMS-10)	CosmoBio/Kal-KH011	1:30
Anti-alfa SMA	Sigma A2547	1:600
Anti-BrdU	Zymed 03-3900	1:50
Anti-Vimentina	Abcam/ab7752	1:100
Anti-E-caderina	Zymed 13-5700	1:50
Anti-Desmogleína-1	Invitrogen 32-6000	1:16

No dia seguinte, após as lâminas atingirem a temperatura ambiente, essas foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos cada e incubadas com o kit de anticorpos biotinizados de acordo com as instruções do fabricante (EnVision™ + Kits, #K4007 HRP. Mouse (DAB+) Dako, Glostrup, Denmark). Sobre os cortes foi adicionada solução de diaminobenzidina (Sigma D4168), preparada conforme instruções do fabricante, até o aparecimento da coloração castanha (cerca de 1 a 2 minutos). As lâminas foram novamente lavadas em água destilada e realizou-se a contracoloração dos núcleos com Hematoxilina de Mayer (5 minutos). Após nova etapa de lavagem em água destilada (5 minutos) as lâminas foram desidratadas em sequência crescente de alcoóis e xilol e montadas com lamínula e Entellan (Merk 1.0/961.0100).

A imunomarcacão para detecção de DNA fragmentado foi realizada com kit comercial conforme instruções do fabricante Calbiochem®, FragEI™ DNA Fragmentation Detection Kit, Fluorescent – TdT Enzyme, QIA39.

### 3.13 *Avaliação dos produtos de glicacão avançada (AGEs) via kit ELISA.*

A presença dos AGEs totais no homogenato das peles reconstruídas foi avaliada através de imunoensaio ELISA, com o kit comercial OxiSelect™ Advanced Glycation End Product (AGE) ELISA Kit (Cell Biolabs®, INC, ref STA-317), seguindo as instruções do fabricante.

### 3.14 *Análise da expressão gênica via PCR para: Citoqueratinas 10 e 14, Desmogleína e E-Caderina.*

O RNA total foi extraído do lisado das peles reconstruídas utilizando o kit comercial RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando kit commercial High-Capacity cDNA



Reverse Transcription Kit (LifeTechnologies® ref 4368813). A análise quantitativa de PCR real-time foi realizada através do sistema ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem®, New Jersey, USA), utilizando reagentes Taqman (LifeTechnologies). Os dados obtidos foram normalizados de acordo com os níveis de expressão endógena de  $\beta$ -actin (Hs01060665\_g1) e GAPDH (Hs02758991\_g1) das amostras em triplicata. A expressão relativa foi calculada pelo método Delta-Ct (*cycle threshold method*) utilizando as equações seguintes:  $\delta Ct$  (amostra) =  $\delta Ct$  (alvo) – Ct (referência); quantidade relativa =  $2^{-\delta Ct}$ . Os genes alvo avaliados foram: Cytokeratin 10 (Hs01043114\_g1, gene KRT10), Cytokeratin 14 (Hs00265033\_m1, gene KRT14), Desmoglein (Hs00355084\_m1, gene DSG1) and CDH1 (E-Cadherin - Hs01023894\_m1, gene CDH1).

### 3.15 Análise da expressão proteica via western blot.

Os compartimentos dérmico ou epidérmico foram separados mecanicamente com auxílio de pinças e maceradas mecanicamente na presença de 100 $\mu$ L de tampão RIPA, preparado conforme descrito na **Tabela 5** abaixo, em gelo. Após a completa desagregação tecidual, o homogenato tecidual foi mantido em gelo em contato com o tampão por 15 minutos e então derme ou epiderme foram passadas por agulha fina a fim de lisar completamente as células aumentando o rendimento proteico. Os tubos foram centrifugados á 4°C por 15 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi mantido à - 80°C até o momento dos experimentos.

Tabela 5: Componentes do tampão de lise celular, RIPA.

<b>Tampão RIPA (q.s.p 10mL)</b>	
NaCl 5M	300uL
TrisHCl (1M pH 7.5)	500uL
Ninodet P40	500uL
EDTA 0,125mM	8uL
H <sub>2</sub> O milli-Q	8,692uL

Inibidor de Proteases e Fosfatases (vide bula – S8820 SigmaFAST®)	1mL
---	-----

As proteínas totais presentes nos homogenatos de derme ou epiderme foram medidas pelo método de Bradford, utilizando como curva padrão a Albumina Sérica Bovina. Após dosagem, 30 ~ 50 microgramas de cada amostra foram preparadas em tampão de amostra separadas em gel de agarose gradiente comercial (4 – 15%, Mini-PROTEAN® TGX™ Bio-Rad) com 90 V por 70 minutos.

A transferência das proteínas do gel para membrana de PVDF foi realizada em geladeira a 70 V por 3 horas. Fez-se então o bloqueio da membrana com leite desnatado 2% por 1 hora seguida da incubação com anticorpo primário anti-CML (1:200) ou anti-p21 (1:200). O controle das proteínas endógenas foi realizado em corte da membrana distante das proteínas de interesse, com anticorpo anti-viculina (1:5000). Após incubação overnight a 4 °C sob agitação, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários em solução de leite 2% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação, seguida de nova etapa de lavagem.

A revelação se deu com uso de filme radiográfico pelo kit de detecção luminescente *ECL Western blotting detection reagents* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia). A quantificação das bandas geradas foi realizada pelo software *Image J*.

### 3.16 *Análise dos resultados*

Os resultados foram expressos como media  $\pm$  erro padrão de três experimentos isolados realizados em triplicata (as replicatas para cada experimento foram especificadas nas legendas). As análises foram realizadas através da comparação dos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo controle. Para análise estatística

realizamos a análise de variância (ANOVA) e utilizamos o teste de comparações múltiplas Teste de Tukey comparando cada grupo experimental ao grupo controle.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 *Ensaio de Citotoxicidade*

Não foram observados efeitos tóxicos da Aminoguanidina e Carnosina frente aos fibroblastos humanos em nenhuma das concentrações e tempos descritos, conforme observado nas **Figuras 8 e 9** abaixo.

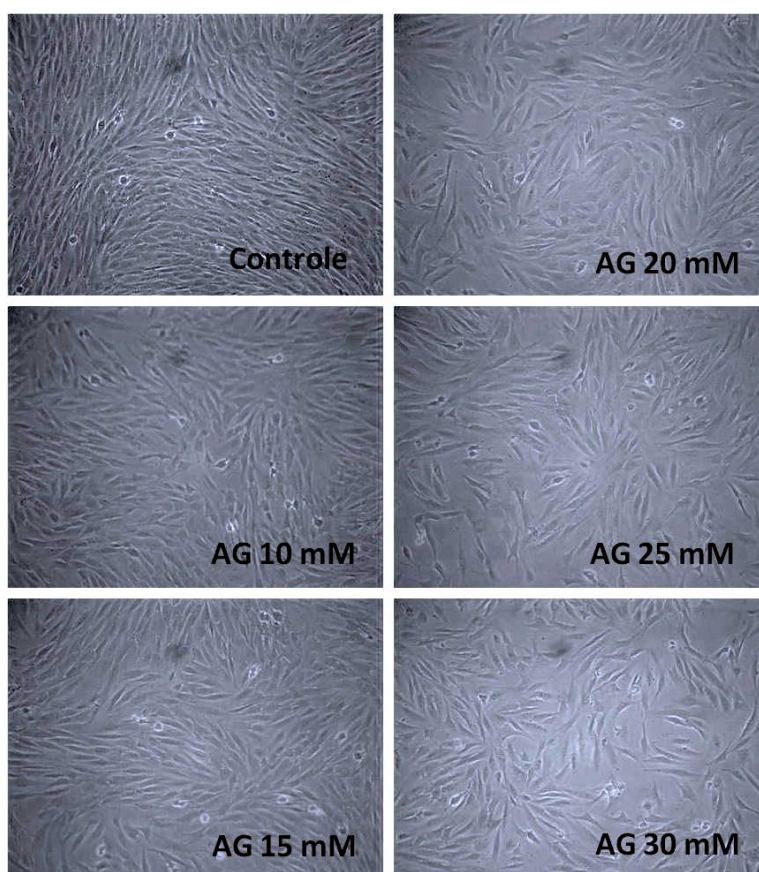
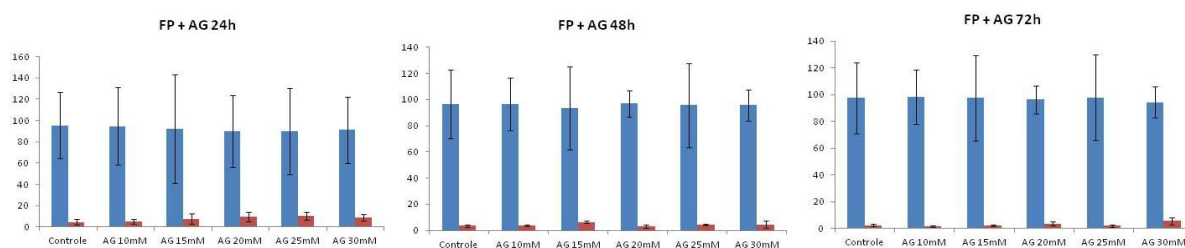


Figura 8. Fotomicrografia dos fibroblastos humanos frente ao composto anti-glicante Aminoguanidina (AG) nas diferentes concentrações. Aumento 20x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo)



Em azul: células vivas, em vermelho: células mortas.

Figura 9. Viabilidade dos fibroblastos humanos (% de células viáveis) frente à molécula anti-glicante Aminoguanidina em diversas concentrações nos tempos de 24, 48 ou 72 horas de exposição. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo)

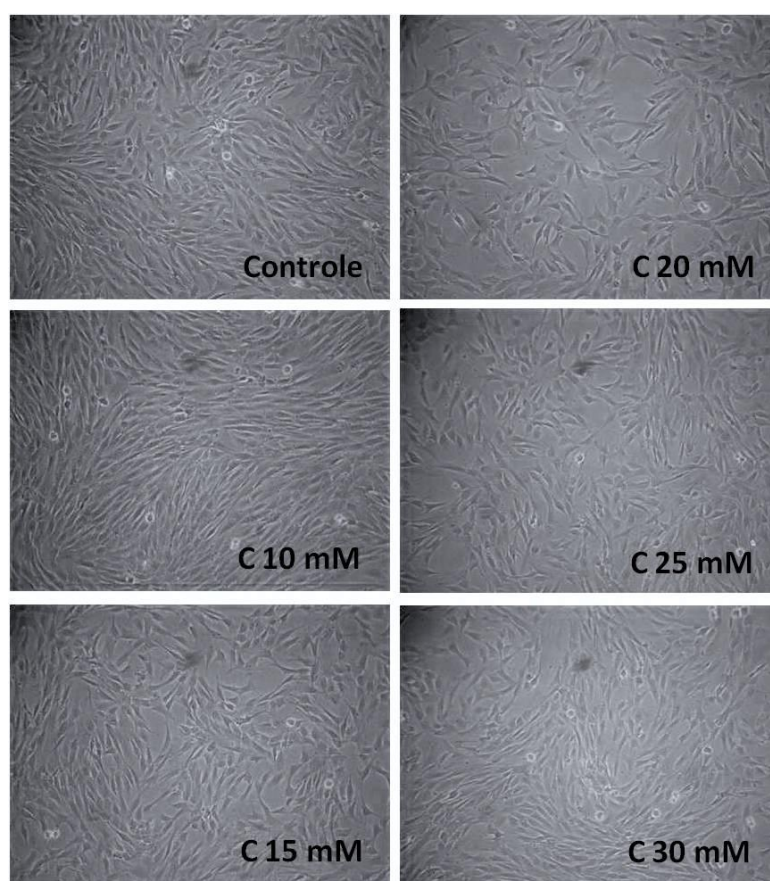
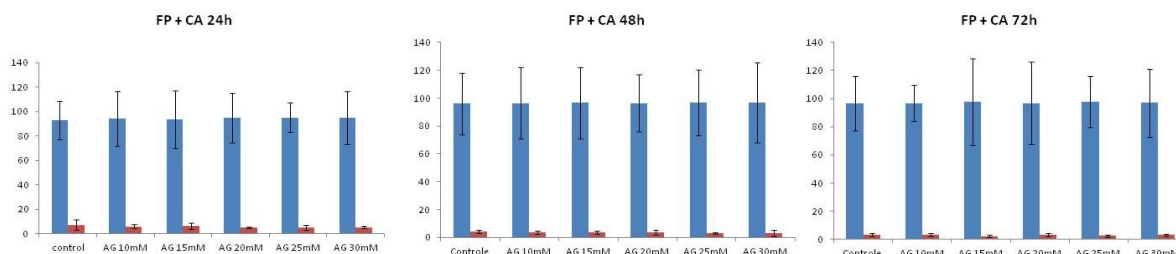


Figura 10. Fotomicrografia dos fibroblastos humanos frente ao composto anti-glicante Carnosina (C) nas diferentes concentrações. Aumento 20x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo)



Em azul: células vivas, em vermelho: células mortas.

Figura 11. Viabilidade dos fibroblastos humanos (% de células viáveis) frente à molécula anti-glicante Carnosina em diversas concentrações e tempos de exposição de 24, 48 ou 72 horas. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo)

Conforme observado nas **Figuras 10 e 11**, acima, as moléculas Aminoguanidina e Carnosina não apresentaram efeitos tóxicos sobre os fibroblastos da derme humana, nas concentrações e tempos testados, visto que os tratamentos não alteraram significativamente a viabilidade celular.

#### 4.2 Obtenção do Colágeno tipo I

Foi observado que o colágeno extraído de cauda de ratos diabéticos (glicado) apresentava-se mais espesso e opaco que o colágeno obtido de animais controle (**Figura 12**), esses dados estão de acordo com nossas expectativas, já que a deposição dos AGEs na proteína de colágeno causam um remodelamento das fibras que se tornam entrelaçadas (*crosslink*), alterando a conformação habitual desta rede proteica (Paeon et al, 2007).

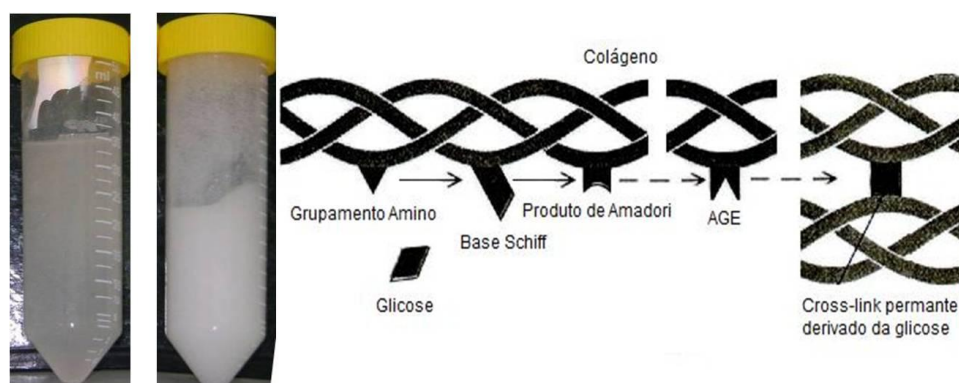


Figura 12. Representação do colágeno tipo I glicado. Tubo à esquerda: aspecto do gel de colágeno extraído de cauda de rato adulto saudável. Tubo à direita: colágeno extraído de rato diabético. Esquema do "cross-link" nas fibras de colágeno tipo I adaptado de <http://www.life-enhancement.com/magazine/article/369-more-evidence-for-eye-health-lower-age-with-acetyl-l-carnitine>, acesso em 24/outubro/2015

Após a obtenção do colágeno de tendão de cauda de rato ou comercial (BD<sup>®</sup>) partimos para as metodologias glicação “in vitro” e análise da integridade da proteína por análise eletroforética em gel dodecil-sulfato de sódio/poliacrilamida (SDS-PAGE) e grau de glicação por fluorimetria.

#### 4.3 Glicação do gel de Colágeno tipo I

A fim de verificar a funcionalidade do protocolo de fluorimetria, descrito por Pagon e colaboradores (2008), em nosso laboratório realizamos uma leitura prévia da fluorescência das amostras conhecidamente glicadas, como um “controle positivo” da autofluorescência. Para tanto, amostras de albumina sérica humana proveniente de indivíduos saudáveis ou de pacientes diabéticos em fase de descompensação glicêmica, foram gentilmente cedidas pela Professora Doutora Marisa Passarelli, chefe do Laboratório de Lípidos - LIM-10 da FMUSP, e aferidas quanto à autofluorescência, indicativa da presença de AGEs. Além disso, comparamos esses dados à fluorimetria em colágeno de cauda de ratos jovens (45 dias de vida), adultos (163 dias de vida) ou diabéticos (diabetes tipo I induzido por injeção intraperitoneal de aloxana, glicemia superior à 300 mg/dl por 86 dias), conforme **Figura 13** abaixo.

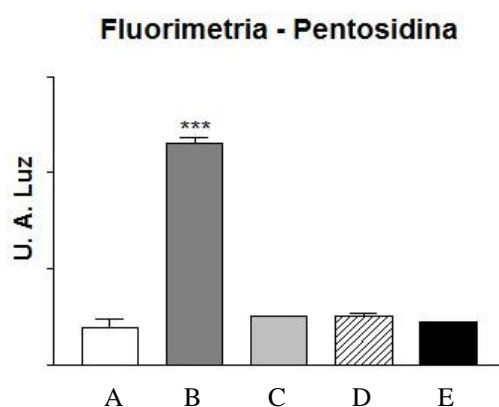


Figura 13. Aferição de autofluorescência. A: albumina sérica humana controle; B: albumina sérica humana diabética; C: colágeno de ratos jovens; D: colágeno de ratos adultos; E: colágeno de ratos diabéticos. Comprimento de onda de excitação: 328nm e emissão 378nm para pentosidina. Experimento realizado em triplicata (n=3 por grupo). (\*\*\*)p<0,001). U.A.Luz: unidades arbitrárias de luz.

Conforme observado na **Figura 13** o método de aferição da fluorescência mostrou-se válido, apontando a grande diferença entre a emissão de luz pelo AGE pentosidina na amostra de albumina sérica de paciente diabético em comparação com a albumina de indivíduo saudável ( $***p < 0,001$ , aumento de 75% na emissão de luz), o que está de acordo com o esperado. Porém, contrariando nossas expectativas, não observamos diferenças com significância estatística entre as amostras de colágeno tipo I obtido de tendão de caudas de ratos jovens (45 dias de vida), adultos (163 dias de vida) ou diabéticos (glicemia superior à 300 mg/dl, por 86 dias). Este fato pode ter ocorrido devido ao sítio anatômico de obtenção do colágeno, os tendões de cauda, já que a região recebe menor irrigação sanguínea se comprada à pele, por exemplo, e o tempo de exposição às condições normoglicêmicas podem não ter sido suficiente para que a reação completa da geração dos AGEs ocorresse. O mesmo pode ter ocorrido em relação aos animais diabéticos, mantidos por 86 dias com glicemia elevada, tempo que pode ter sido insuficiente para gerar danos permanentes no colágeno da cauda.

O acúmulo dos AGEs na pele têm sido descrito na literatura não somente nos pacientes diabéticos, mas também devido ao envelhecimento cronológico (Jeanmarie et al, 2001) e a glicação tem sido diagnosticada através da autofluorescência nesses indivíduos (Corstjens et al, 2008). Proteínas de vida longa como o colágeno tipo I, predominante na derme, e tipo IV, abundante na membrana basal são alvos frequentes da glicação, já que seu “*turnover*” é lento (cerca de 10~15 anos), o que os torna possíveis biomarcadores para avaliação do envelhecimento da pele pela geração dos AGEs (Jeanmarie et al, 2001). Estudos anteriores demonstram o aparecimento de colágeno glicado na pele humana à partir dos 20 anos de idade, essa taxa de colágeno glicado aumenta cerca de 3,7% ao ano, chegando a atingir 30 a 50% do colágeno total aos 80 anos (Jeanmarie et al, 2001; Dunn et al, 1991).

Confirmada a eficácia da fluorimetria e obtidos padrões de emissão de luz, passamos à fase de fluorimetria no colágeno tipo I comercial glicado *in vitro* por três diferentes protocolos experimentais conforme descrito anteriormente. Utilizando para tanto os três diferentes agentes glicantes, o ácido glioxílico, a ribose e o glioxilato de sódio, a fim de estabelecermos a metodologia mais adequada.

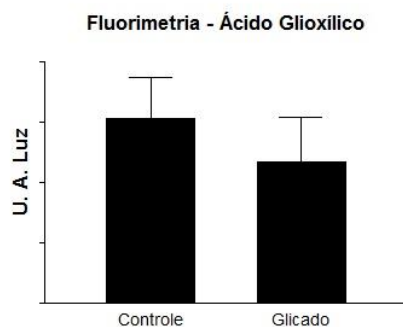


Figura 14. Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle ou glicado por Ácido Glioxílico. Excitação de 328nm e emissão de 378nm, específica para pentosidina. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz.

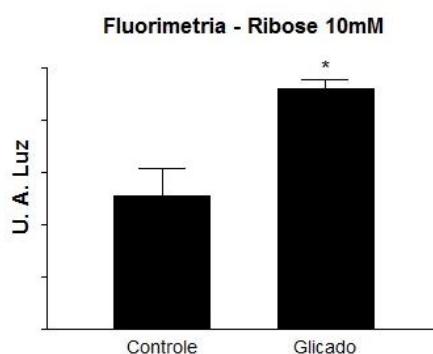


Figura 15. Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle ou glicado por Ribose 10mM. Excitação de 328nm e emissão de 378nm, específica para pentosidina. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo). \*(p<0,05). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz.

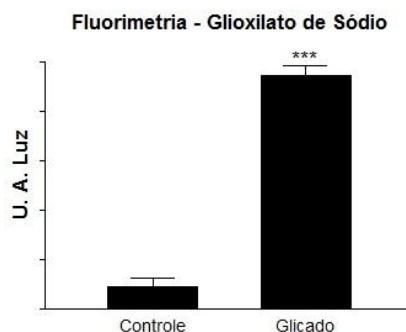




Figura 16. Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle ou glicado por Glicoxilato de Sódio. Excitação de 328nm e emissão de 378nm, específica para pentosidina. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo). \*\*\*( $p < 0,001$ ). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz.

Conforme observamos nas **Figuras 14, 15 e 16** acima, obtivemos resultados positivos na geração de AGEs com as glicações *in vitro* do colágeno tipo I comercial pela incubação com ribose 10mM por 1 mês (**Figura 15**) (Pageon et al, 2008) e pela incubação com glicoxilato de sódio por 24 horas (**Figura 16**) (Alikhani et al, 2006). A glicação do colágeno descrita por Liao e colegas (2009), utilizando o ácido glicóxico como agente glicante, em incubação com o colágeno por 24 horas (**Figura 14**), não demonstrou níveis satisfatórios de geração de fluorescência, indicando que o processo de glicação *in vitro*, neste caso, não foi eficiente. Desta forma descartamos o procedimento adotado por Liao e colegas (2009) e mantivemos como padrão o protocolo de Alikhani e colegas (2006), que utilizam glicoxilato de sódio como agente glicante (**Figura 16**), já que a emissão de luz pelos AGEs, gerados neste caso, mostrou-se mais significativa (\*\* $p < 0,001$ , aumento de 90% na emissão de luz), e por se tratar de uma metodologia mais rápida do que a glicação pela ribose (**Figura 15**), também significativa (\* $p < 0,05$ , aumento de 40% na emissão de luz).

Partimos então para a incubação com os agentes glicantes glicoxilado de sódio ou ribose na presença dos inibidores de glicação, aminoguanidina e carnosina. Primeiramente realizamos a glicação mais lenta e progressiva (1 mês) com Ribose em 10mM (Pageon et al, 2008) na presença da AG, o inibidor de AGEs clássico, melhor descrito na literatura (Brownlee et al, 1986; Sell et al, 2001) nas concentrações de 10mM (Pageon et al, 2008), 15mM, 20mM (Alhamdani et al, 2007), 25mM e 30mM. Os resultados apresentam-se na **Figura 17** abaixo.

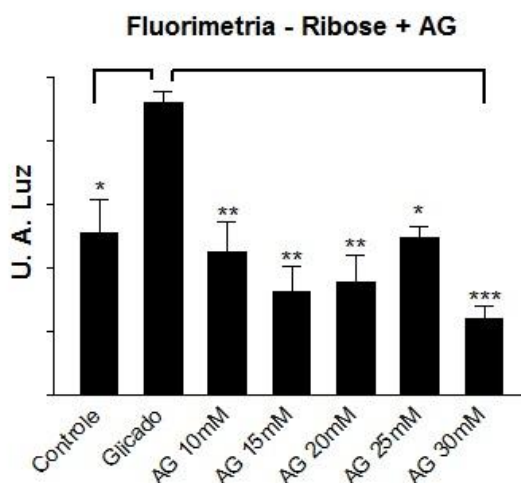


Figura 17: Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle, incubado com ribose 10mM por 1 mês ou incubado com ribose 10mM na presença do inibidor aminoguanidina (AG) em 10, 15, 20, 25 ou 30mM por 1 mês. Excitação de 370nm e emissão de 440nm, abrangente para AGEs totais. Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental (n=18 por grupo) \*(p<0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz.

Podemos observar na **Figura 17**, que a AG realmente foi capaz de inibir a glicação em longo prazo, pela incubação conjunta deste composto com o agente indutor de glicação, ribose 10mM, em todas as concentrações testadas quando comparadas ao colágeno glicado na ausência da AG.

A partir deste dado realizamos a glicação rápida, contando com glioxilato de sódio como glicante na presença de aminoguanidina ou carnosina, na concentração de 30mM (**Figura 18**), já que a concentração de 30mM foi aquela que apresentou maior significância (\*\*\*p<0,001, diminuição de 65% na emissão de luz em comparação com o glicado) na inibição da glicação lenta (com ribose 10mM).

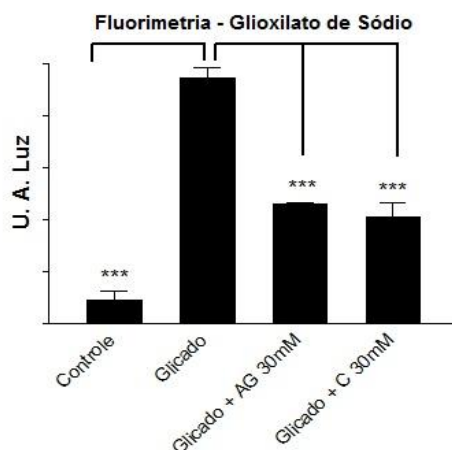


Figura 18: Aferição da fluorescência emitida pelos AGEs presentes no colágeno controle, incubado com glioxilato de sódio ou com glioxilato de sódio na presença dos inibidores aminoguanidina (AG) ou carnosina (C). Excitação de 370nm e emissão de 440nm, representativa para AGEs totais  $*** (p < 0,001)$ . Experimento realizado em triplicata biológica e sextuplicata experimental ( $n=18$  por grupo). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz.

Conforme observamos na **Figura 18** acima ambos os inibidores de glicação, AG e C, na concentração de 30 mM foram capazes de prevenir de forma muito significativa ( $***p < 0,001$ , diminuição de 50 a 55% na emissão de luz em relação ao glicado) a geração dos AGEs no colágeno quando incubadas durante o processo de glicação (24 horas). Depois de padronizada e confirmada a glicação, o colágeno foi ressuspenso e reorganizado em gel tridimensional para que fosse utilizado como substrato para os fibroblastos humanos e na reorganização da derme. Sobre esta estrutura dérmica, os queratinócitos e melanócitos humanos foram cultivados conforme descrito anteriormente.

#### 4.4 *Confecção da Pele Humana Reconstruída*

Para a confecção das peles humanas reconstruídas (PHR) utilizamos o elemento de MEC, colágeno tipo I glicado, cuja glicação foi previamente confirmada através da análise fluorimétrica ou incubado com o agente glicante na presença dos inibidores de glicação AG e C. Para que ocorresse a fase de polimerização do colágeno, utilizamos o colágeno modificado pela glicação ou pelos tratamentos em conjunto com colágeno

controle comercial não tratado (Pageon et al, 2008). Essa “diluição” do colágeno glicado não interferiu nos efeitos decorrentes da glicação, visto que, mesmo estando em proporção 1:1 com colágeno comercial sem nenhum tratamento os índices de emissão de fluorescência, indicativo da presença dos AGEs ainda se mostram significativamente superiores ao colágeno controle puro, conforme mostrado na **Figura 19** abaixo.

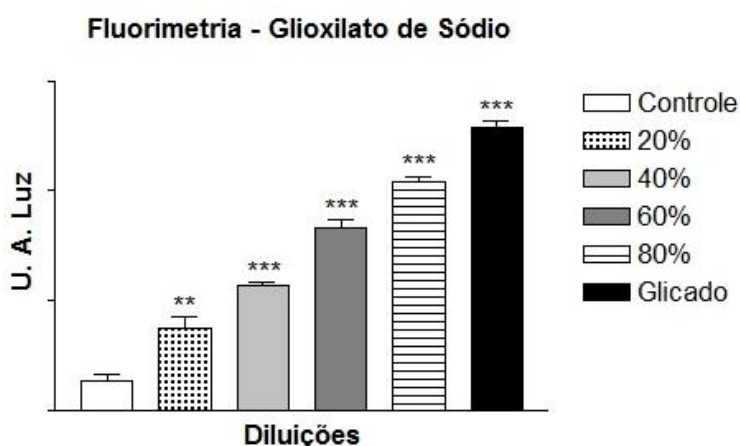


Figura 19. Fluorimetria de colágeno tipo I controle, glicado com glicoxilato de sódio ou em diluições graduais (controle + glicado). As porcentagens referem-se à proporção de colágeno glicado presente na amostra. Excitação 370nm, emissão 440nm, referente à AGEs totais. \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Experimento realizado em sextuplicata experimental ( $n=6$  por grupo). U. A. Luz: unidades arbitrárias de luz

Na **Figura 19** observamos que a partir de 20% de presença de colágeno glicado somado ao colágeno controle, os índices de emissão de luz pelos AGEs já se mostram estatisticamente superiores (\*\* $p < 0,01$ ) e à partir de 40% de colágeno glicado essa significância aumenta (\*\* $p < 0,001$ ) ao controle não glicado. Este dado comprova que, mesmo sendo necessária a diluição do colágeno glicado em colágeno controle numa proporção de 1:1 (50%) para que ocorra a polimerização, ainda é mantido um percentual de AGEs que garanta um ambiente suficientemente alterado para geração da PHR glicada.

Após a montagem das PHRs, conforme anteriormente descrito, obtivemos as peles com padrões diferentes de contração e estratificação. Uma imagem macroscópica representativa das peles geradas pode ser observada abaixo.

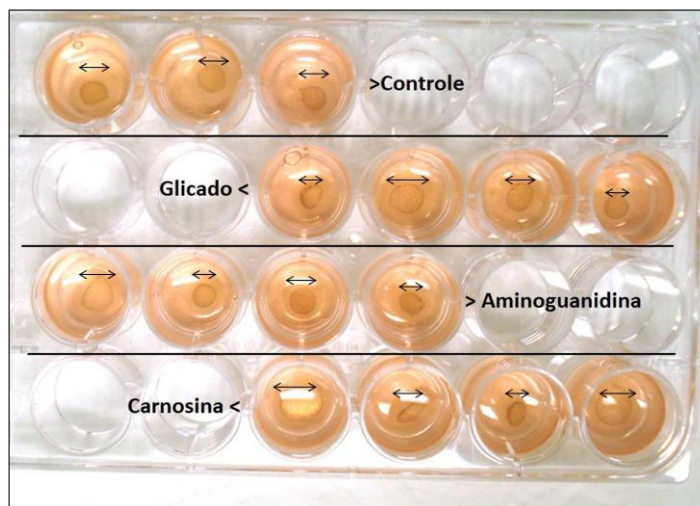


Figura 20. Aspecto macroscópico das PHRs controle, glicada (glioxilato de sódio), glicada tratada com aminoguanidina 30mM ou com carnosina 30mM

Conforme se observa na **Figura 20** as peles controle se apresentam mais regulares quanto à contração colagênica, mostrando-se bem arredondadas. Já as peles glicadas, ou glicadas tratadas com AG ou CA apresentam contorno e tamanho irregular, sugerindo uma matriz mais delgada e desorganizada. Essas observações macroscópicas foram confirmadas após a análise dos cortes histológicos.

#### 4.5 Análise Morfológica da Pele Reconstituída

As PHRs controle apresentaram uma morfologia semelhante à pele humana nativa (**Figura 21**), com a presença de um compartimento dérmico bem estruturado e uma epiderme estratificada e diferenciada, como pode ser observado nos painéis abaixo.



Figura 21. Fotomicrografia de pele humana nativa, secção de 5µm em parafina histológica, corada com Hematoxilina & Eosina, em aumento de 40x.

Fonte: modificado de Brohem et al, 2011.

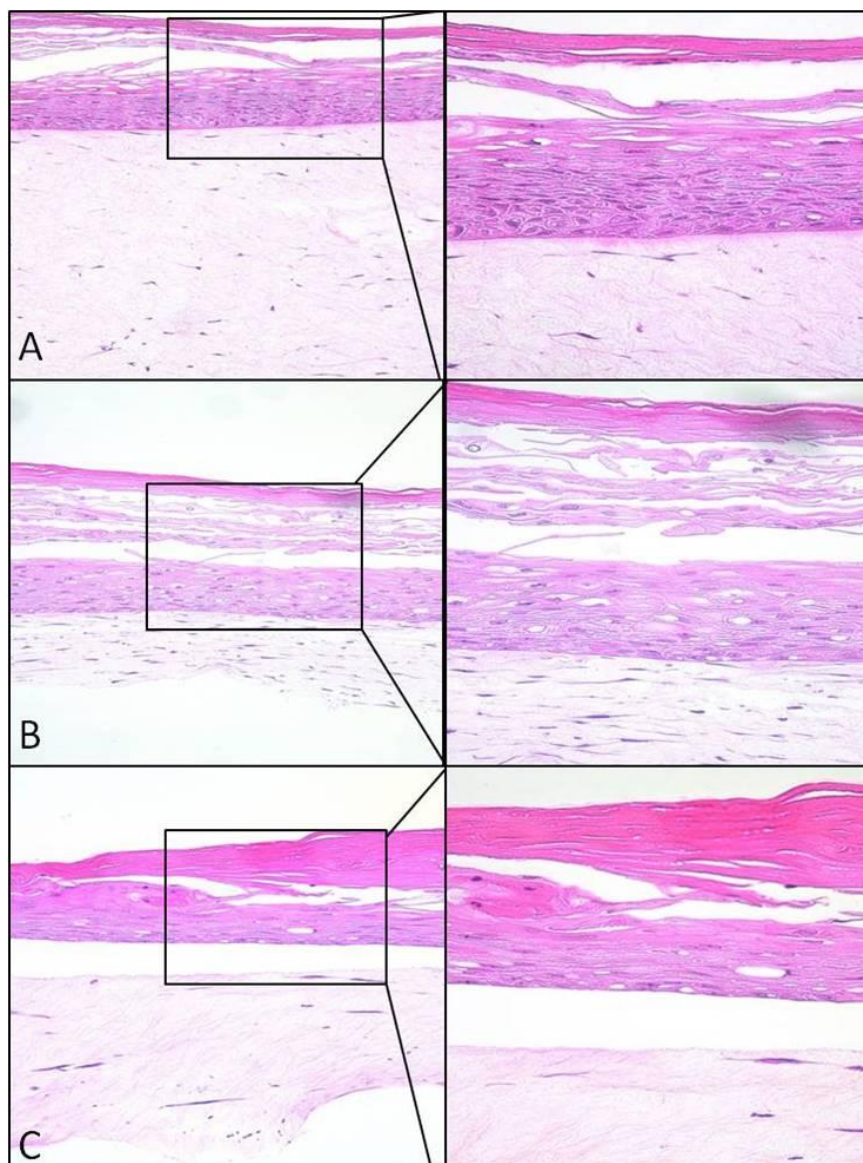


Figura 22. Fotomicrografia de PHR, A. controle, B. glicada com Ribose 10mM e C. glicada com Ribose 10mM na presença de aminoguanidina (AG) 30mM, coradas com Hematoxilina & Eosina, em aumento de 20x e detalhe à direita em 40x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo).

Geramos a PHR, controle ou modificada pela glicação com a Ribose 10 mM (**Figura 22**) a fim de verificar as alterações que essa alteração da matriz de colágeno poderia causar na estrutura geral da pele. Observamos que na pele glicada com ribose 10mM o compartimento dérmico parece estar mais delgado em comparação com o controle, além disso, observamos maior vacuolização na epiderme, que nos indica que o processo de glicação interferiu na viabilidade dos queratinócitos, aparentemente tornando-os menos saudáveis. Testamos também o efeito do inibidor de glicação, AG 30

mM, em incubação conjunta com o colágeno ao longo do processo de glicação (1 mês) e observamos que a AG preveniu a vacuolização da epiderme. Testamos também o efeito do inibidor carnosina nas peles (dados não mostrados), porém, mesmo com a comprovada prevenção da formação de AGEs no colágeno tipo I, a qualidade da estratificação epitelial foi grandemente prejudicada por este composto, o que nos fez optar por prosseguir com testes apenas utilizando a AG.

Partimos então para a confecção da pele reconstruída modificada pela glicação do colágeno pelo glioxilato de sódio (**Figura 23**). Como observado anteriormente na pele glicada com ribose, notamos que a epiderme da pele glicada pelo glioxilato de sódio também aparenta ser menos saudável e proliferativa, devido a maior presença de vacúolos nos queratinócitos quando comparada à pele controle.

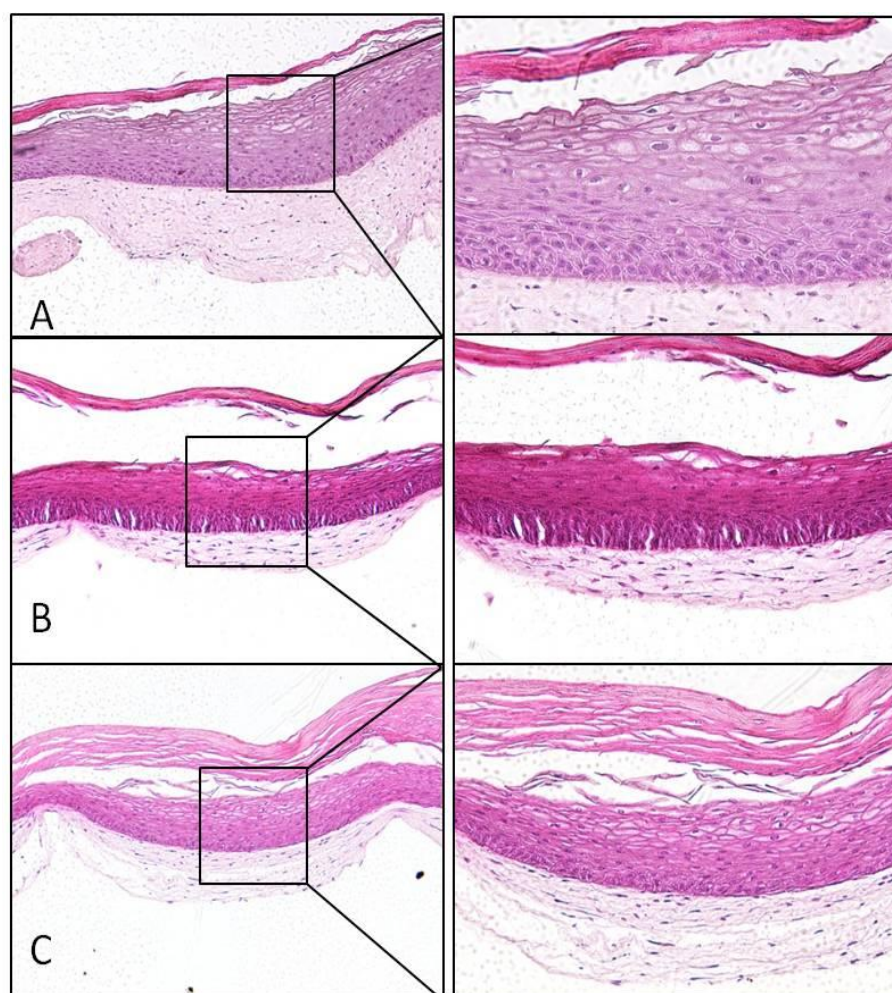


Figura 23. Fotomicrografia de PHR. A: controle; B: glicada com glioxilato de sódio; C: glicada com glioxilato de sódio na presença de aminoguanidina 30mM. Coradas com Hematoxilina & Eosina. Aumento de 20x e detalhe à direita em 40x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo).

Observamos na **Figura 23** que houve estratificação da pele controle (**Figura 23.A**) semelhante ao que observamos em cortes de pele humana nativa (**Figura 21**), o que nos indica que os queratinócitos estavam saudáveis e proliferativos no momento do plaqueamento. Neste experimento também foi possível ver claramente os efeitos da glicação na pele (**Figura 23.B**) como, por exemplo, derme retraída e a epiderme vacuolizada, com menos camadas de diferenciação, conforme nossas expectativas (Paeon et al, 2008). Notamos também que o tratamento com a AG 30 mM (**Figura 23.C**) preveniu o quadro de vacuolização dos queratinócitos e da compactação da epiderme observada na pele glicada, esse fato se deve ao potencial da aminoguanidina de se ligar aos compostos reativos intermediários no processo de formação dos AGEs, os Produtos de Amadori, impedindo que estes se estabilizem e formem os AGEs (Thornalley & Yurek-George, 2000) e pelo seu forte potencial antioxidante já que sabe-se que a glicação não enzimática, é dependente de processos de oxidação, desidratação e ciclização para a estabilização dos os AGEs (Lapolla et al, 2004).

Esses dados nos indicam que o tratamento com a AG não exerce efeitos tóxicos às células de pele humana ao contrário da própria glicação que causou vacuolização do epitélio, indicando uma atrofia do compartimento epidérmico, fato também observado em peles envelhecidas modificadas pela glicação com Ribose (Gkogkolou & Böhm, 2012). Além disso, notamos que a derme glicada mostrou-se mais delgada, indicando redução de deposição de MEC dérmica, fato também já demonstrado em estudos anteriores que indicam a formação de compartimento dérmico menos espesso (Gkogkolou & Böhm, 2012), e menor capacidade de secreção de colágeno por parte dos fibroblastos em indivíduos com altas concentrações de AGEs (Rowe et al, 1977; Hehenberger et al, 1997).



Para uma análise mais profunda das alterações da trama colagênica pela formação dos AGEs partimos então para uma nova metodologia, a microscopia confocal multifotônica.

#### 4.6 *Análise multifotônica da pele reconstruída glicada*

Conforme previamente descrito, utilizamos as lâminas histológicas, coradas com Hematoxilina & Eosina, para a geração das imagens das peles em segundo harmônico, tipo de captura de luz gerada pela Microscopia Confocal Multifotônica. Primeiramente realizamos a análise das peles glicadas pela Ribose 10 mM.

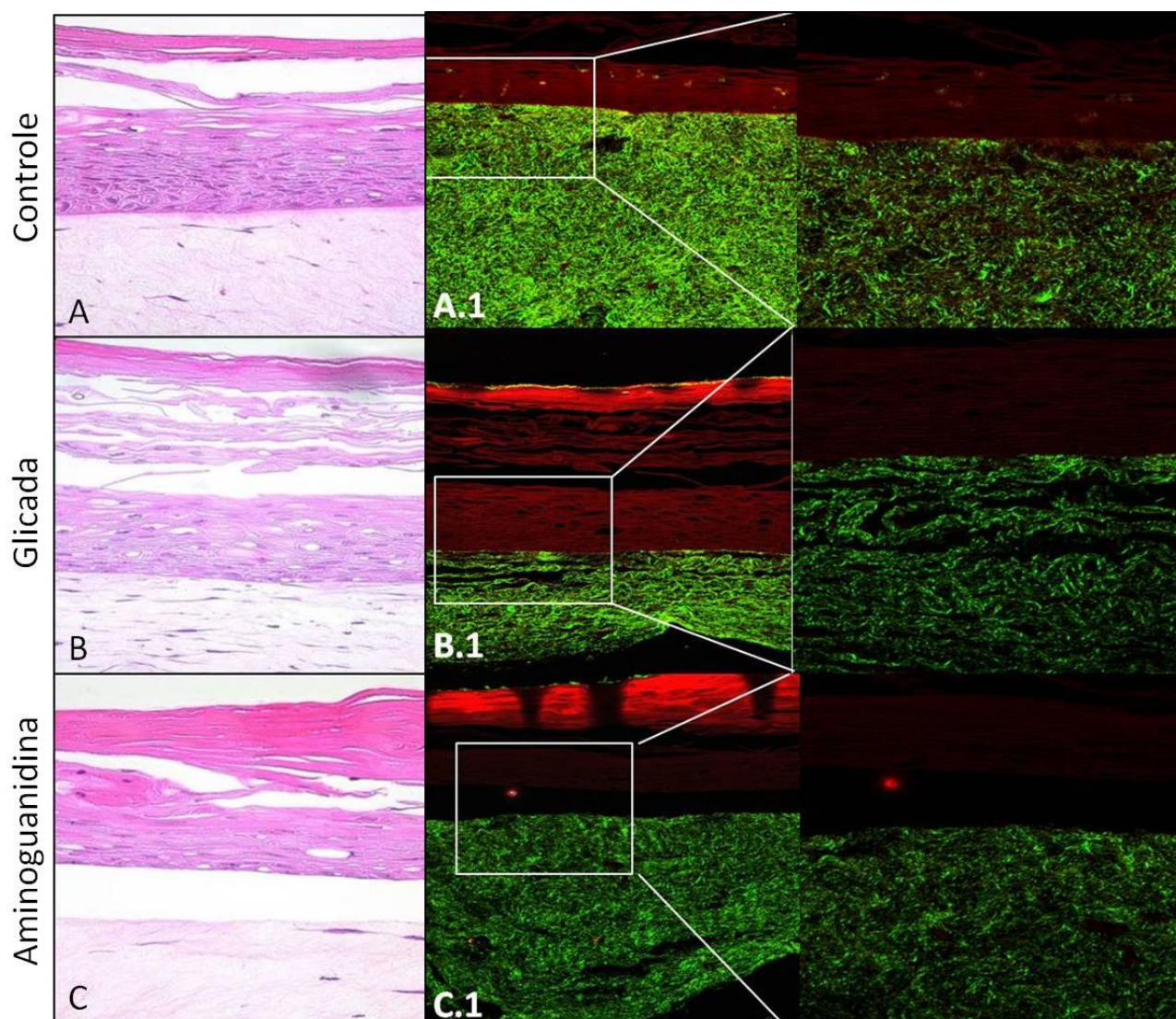


Figura 24. Aspecto morfológico das peles controles e glicadas com ribose 10mM. Coluna à esquerda: A: PHR controle; B. PHR glicada; C: PHR tratada com AG. Na coluna central (A.1, B.1 e C.1) a imagem representativa da reflexão, indicativo das fibras íntegras de colágeno tipo I (em verde) via geração de luz em segundo harmônico (SHG) por microscopia confocal multifóton (Zeiss LSM 780 NLO). A epiderme está apresentada em vermelho e representa o espectro de transmissão (células). Coluna à direita: detalhe ampliado da trama colagênica. Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo).

Observamos na **Figura 24** que o processo de glicação pela ribose 10 mM alterou a conformação das fibras de colágeno presentes na derme (detalhe da **Figura 24.B**) o que era esperado, a AG inibiu essas alterações (**Figura 24.C**). Além disso, notamos também a maior deposição de grânulos de queratina no extrato córneo das peles glicadas na presença de AG, se comparadas à pele controle (**Figura 24.B**) marcados como pontuações verdes sobre o extrato córneo epidérmico. Isto pôde ser observado

graças à capacidade de emissão de autofluorescência pela queratina, quando excitada no comprimento de onda do ultravioleta (~300 - 400 nm), mesmo comprimento de emissão SHG, sendo a metade do comprimento de excitação (~700 - 800 nm). Este comprimento de emissão também é semelhante ao comprimento de excitação da autofluorescência de colágeno tipo I presente contendo AGEs (Pena et al, 2005).

Realizamos então a análise das peles glicadas com glioxilato de sódio, nas quais observamos os mesmos efeitos, conforme **Figura 25** abaixo.

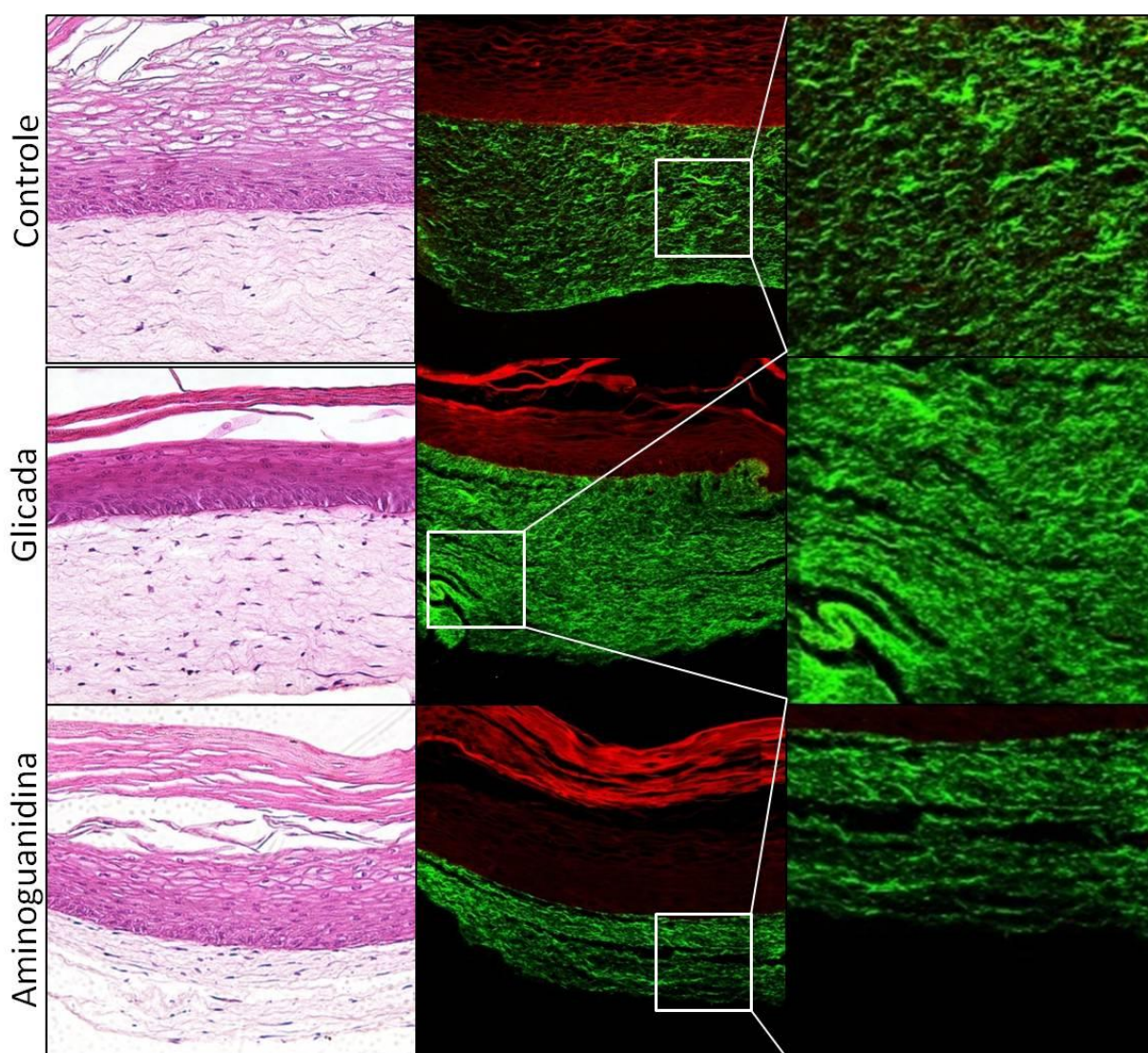


Figura 25. Aspecto morfológico das PHRs controles e glicadas glioxilato de sódio ou tratadas com AG 30mM. Coluna à esquerda: morfologia por coloração Hematoxilina & Eosina. Coluna central: imagem representativa da reflexão, indicativo das fibras íntegras de colágeno tipo I (em verde) via geração de luz em segundo harmônico (SHG) por microscopia confocal multifóton (Zeiss LSM 780 NLO). A epiderme está apresentada em vermelho e representa o espectro de transmissão (células). Coluna à direita: detalhe ampliado da trama colagênica. Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental (n=9 por grupo).

Quando observamos a pele glicada com glioxilato de sódio sob a microscopia confocal multifóton visualizamos claramente os efeitos da glicação sobre o padrão de organização das fibras de colágeno na derme. Observa-se na **Figura 25**, que os feixes de colágeno na pele glicada apresentam-se menos organizados do que os da pele controle, com aspecto de “achatamento” ou compactação da matriz dérmica, o que está de acordo com nossas expectativas, já que a glicação leva ao *crosslink* do colágeno (Pageon et al, 2008), fenômeno que modifica suas propriedades biomecânicas, levando-o à rigidez e perda da flexibilidade observada nos pacientes diabéticos e indivíduos idosos (Avery & Bailey, 2006).

O colágeno apresenta-se eficiente na geração de segundo harmônico de luz incidente devido a sua estrutura em tripla hélice a qual não é centro-simétrica, ele também pode produzir TPEF (do inglês: *Two Photon Excited Fluorescence*) quando irradiado com laser em regiões chamadas *near infrared*, como já demonstrado em culturas organotípicas no trabalho de Zoumi e colaboradores (2002). As imagens apresentadas obtidas em nosso trabalho se assemelham àquelas geradas pela histologia convencional quanto à morfologia e orientação do colágeno (Chu et al, 2007). Observamos pela análise em microscopia multifotônica que a trama colagênica tanto da pele reconstruída glicada com ribose 10 mM quanto com glioxilato de sódio apresenta distribuição desorganizada dos feixes de colágeno, diferentemente do que se observa na pele controle. Além disso, essa derme mostrou-se mais delgada, demonstrando redução de deposição de MEC dérmica (Gkogklou & Böhm, 2012) provavelmente, devido à menor capacidade secretória de MEC pelos fibroblastos e perda de água do colágeno devido a glicação (Rowe et al, 1977; Hehenberger et al, 1997).

#### 4.7 *Análise Matemática das alterações nas fibras colagênicas pela glicação*

Os cortes histológicos das PHRs foram submetidos à microscopia SHG conforme demonstrado anteriormente. Os pontos referentes à reflexão (em verde na **Figura 25**), indicativos da estrutura íntegra da tripla hélice do colágeno tipo I foram então transformados em pixels e quantificados conforme descrito na metodologia.

A intensidade dos pixels no compartimento dérmico foi mensurada em áreas circulares escolhidas randomicamente, através de um raio de pixels pré-determinado. Essas áreas circulares foram então transformadas matematicamente de acordo com o delta de intensidade para os pixels, o que indica diretamente a compressão das fibras colagênicas no tecido, o que é passível de ser quantificado conforme observado na **Figura 26**. O canal verde das amostras foi utilizado na quantificação (referente às fibras de colágeno), um algoritmo de detecção de picos de intensidade foi aplicado. A área delimitada circular de raio = 1 foi utilizada para esta análise. Além disso, imagens contendo alta intensidade de valores no interior da área delimitada foram consideradas picos candidatos (Jolliffe, 2002).

Cada pico de compressão colagênica foi indicado como um ponto vermelho (conforme observado na **Figura 26 c - d**). Na pele controle uma média de 4954 picos foram detectados ( $0,036$  picos/pixel<sup>2</sup>), enquanto que nas peles glicadas foram observados em média 10644 picos de compressão ( $0,079$  picos/pixel<sup>2</sup>) (**Figura 26G**).

As alterações observadas na MEC devido à glicação também foram capazes de alterar fenotipicamente o citoesqueleto dos fibroblastos, modificando sua morfologia como pode ser observado na **Figura 26 E e F**. Essas alterações fenotípicas dos fibroblastos em meio glicado foram descritas recentemente pela Doutora Maíra Estanislau Soares de Almeida, em tese de obtenção de título de Doutor (Almeida, 2015).

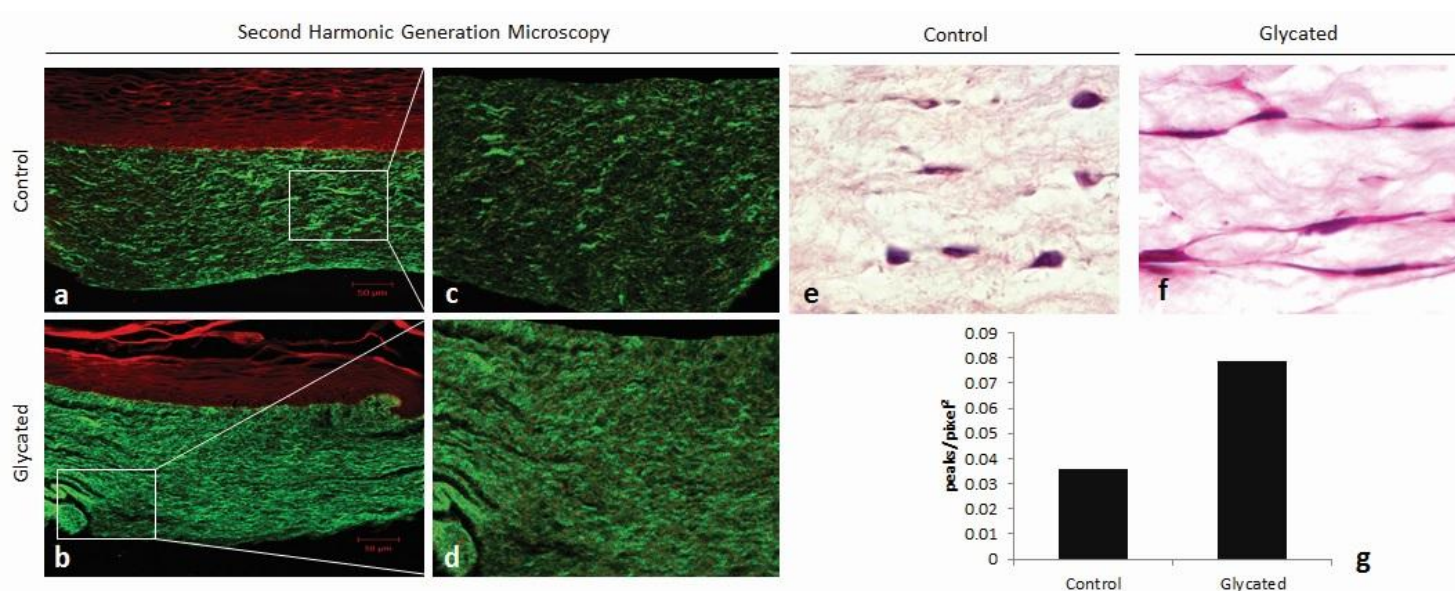


Figura 26: Análise matemática do padrão das tramas colagênicas. A e B: análise do colágeno por SHG. C e D: detalhe da trama colagênica com pontos vermelhos indicativos dos pontos de maior compressão do colágeno. E e F: alteração fenotípica dos fibroblastos imersos na MEC controle ou glicada, corados por Ematoxilina& Eodina, aumento de 40x. G: quantificação dos pixels indicativos de compressão do colágeno. A análise matemática foi realizada pela equipe do Professor Luciano Fontoura, do IF-USP São Carlos-SP. Foram enviadas para análise 6 imagens para cada grupo experimental (n=6 por grupo).

A MEC é definida como uma rede complexa de componentes proteicos, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas secretadas que mantêm as células unidas e, assim, forma uma estrutura tridimensional para tecidos e órgãos, provendo suporte mecânico para as células e integridade estrutural aos tecidos (Cox & O'Byrne, 2001; Pupa et al, 2002; Itoh & Nagase, 2002). Além de seu papel estrutural, a matriz é responsável por sinais regulatórios que desempenham papel importante na adesão celular, diferenciação, proliferação e apoptose. Quando esse microambiente é alterado, por exemplo, devido à ação das metaloproteinases a interação célula-célula e célula-matriz é também modificada, com vias de sinalização também atividades que culminam em diferenciação, sobrevivência, proliferação e motilidade das células (Sternlicht & Werb, 2001; Bissel et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Hojilla et al, 2003; DeClerck, et al, 2004; Kessenbrock et al, 2010). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de proteinases zinco-dependentes que se subdividem em colagenases,

gelatinsas, elastases e estromelinas conforme a especificidade do substrato (Bernaud et al, 1988; Sternlicht & Werb, 2001; Egeblad & Werb, 2002; Brummer et al, 2002).

Sabe-se que a glicação da MEC leva a um aumento na liberação de MMPs (Pageon et al, 2008; Nenna et al, 2015). Investigamos, portanto, a liberação das MMPs 2 e 9 por ensaio de um ensaio preliminar de zimografia, seguido pela análise colorimétrica das MMPs 1, 2 e 9 por meio de kit Biotrack. No ensaio de zimografia observamos uma tendência de declínio da expressão de Pró-MMP 9 e MMP 2, contrário às nossas expectativas (dados não mostrados). Partimos então para uma metodologia mais fidedigna, a análise colorimétrica por meio de kit de ELISA comercial, Biotrack, para análises das MMPs 1, 2 e 9. Para tanto coletamos o sobrenadante das culturas das PHRs em diversos momentos ao longo do período de estratificação – 12 dias (4º, 8º ou 11º dias). Ao realizar o ensaio notamos uma inconsistência nos perfis de liberação de MMPs, pois, a cada momento de coleta do sobrenadante o perfil apresentava-se oposto ao perfil anterior. Nossa expectativa era de que a magnitude de resposta variasse conforme o grau de diferenciação tecidual, porém que o perfil geral das MMPs entre os diferentes grupos experimentais se mantivesse o mesmo. Sendo assim, desconsideramos esse estudo.

#### 4.8 *Padrão de diferenciação dérmica e estratificação epitelial da pele reconstruída glicada*

A fim de estudar o padrão de diferenciação e estratificação epitelial das peles glicadas ou glicadas e tratadas com aminoguanidina em relação às peles controles realizamos reações de imunohistoquímica para os marcadores de diferenciação epitelial citoqueratina 10 e citoqueratina 14, e para confirmar diferenças na proliferação celular foi realizada a imunomarcação para Brdu.

A Citoqueratina 10 é expressa por queratinócitos em elevado grau de diferenciação principalmente, portanto, nas camadas superiores da epiderme. Já a citoqueratina 14 é expressa principalmente pelos queratinócitos indiferenciados e proliferativos, abundantes na camada basal do epitélio. O BrdU (Bromodeoxiuridina) é um nucleosídeo sintético análogo à timina, o anticorpo anti-BrdU é utilizado para avaliar a proliferação celular em tecidos vivos. Essa reação de imunomarcacão pode ser feita pela incubacão dos tecidos com a molécula sintética, BrdU, que é internalizada pelo DNA recentemente sintetizado, indicando a proliferaçã da célula em estudo, e posterior detecçã pelo anticorpo e revelador da reacão. Outra forma de detecçã é a reacão de imunohistoquímica diretamente nos tecidos sem nenhum tratamento prévio, já que, devido a semelhança entre a molécula sintética e a forma natural no nucleosídeo ocorre ligacão do anticorpo. Realizamos a técnica seguindo os dois protocolos, sem encontrar diferenças significativas entre eles.

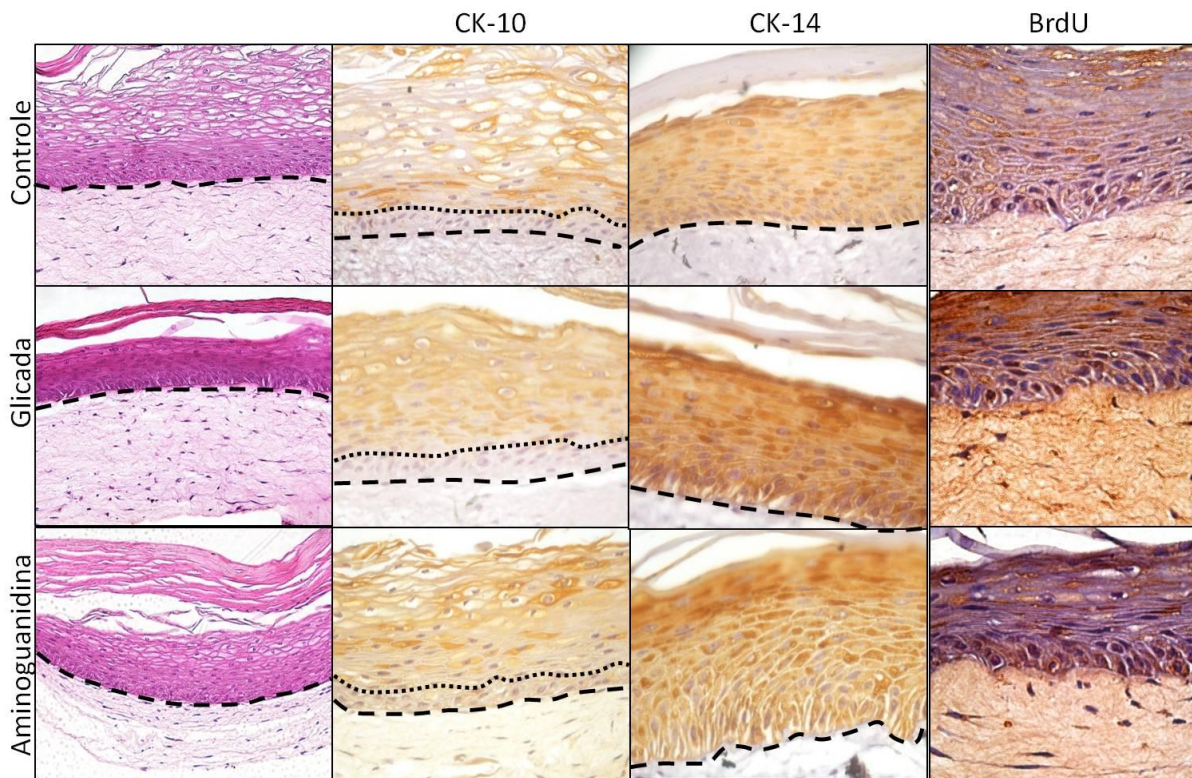


Figura 27: Fotomicrografia de marcadores de diferenciaçã epitelial. Pele reconstruída controle, glicada (glicilato de sódio) e glicada tratada com aminoguanidina 30mM. 1ª coluna: coradas com Hematoxilina &



Eosina; 2ª coluna: imunomarcadas para detecção de Citoqueratina-10; 3ª coluna: Citoqueratina-14 e 4ª coluna: BrdU. Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). As linhas tracejadas se referem ao limite da membrana basal e as linhas pontilhadas se referem ao limite entre o estrato basal e os estratos superiores da epiderme.

Conforme observado na **Figura 27**, observamos que as peles glicadas ou tratadas com aminoguanidina demonstraram o mesmo padrão de diferenciação da epiderme no que se refere às camadas mais estratificadas (marcadas pela citoqueratina-10) quando comparadas às peles controle. Quanto ao estrato mais basal e proliferativo da epiderme, marcado pela citoqueratina-14, observamos uma maior expressão na pele glicada quando comparada às peles controle ou tratada com aminoguanidina.

Observamos também na **Figura 27**, 4ª coluna, que houve uma maior expressão de BrdU no epitélio das peles glicadas. Isso indica que os queratinócitos se mantêm mais proliferativos devido à glicação, o que corrobora com os resultados aumentados de expressão de citoqueratina 14 neste grupo experimental (**Figura 27**, 3ª coluna).

Os dados de expressão de CK-10 e CK-14 foram confirmados por análise por PCR real-time, conforme será descrito mais adiante.

Para a pesquisa dos produtos de glicação gerados fizemos a reação imunohistoquímica dos cortes de peles artificiais com os anticorpos reativos à Carboximetil-lisina (CML) que representa produto de glicação mais abundante e melhor descrito dentre os AGEs.

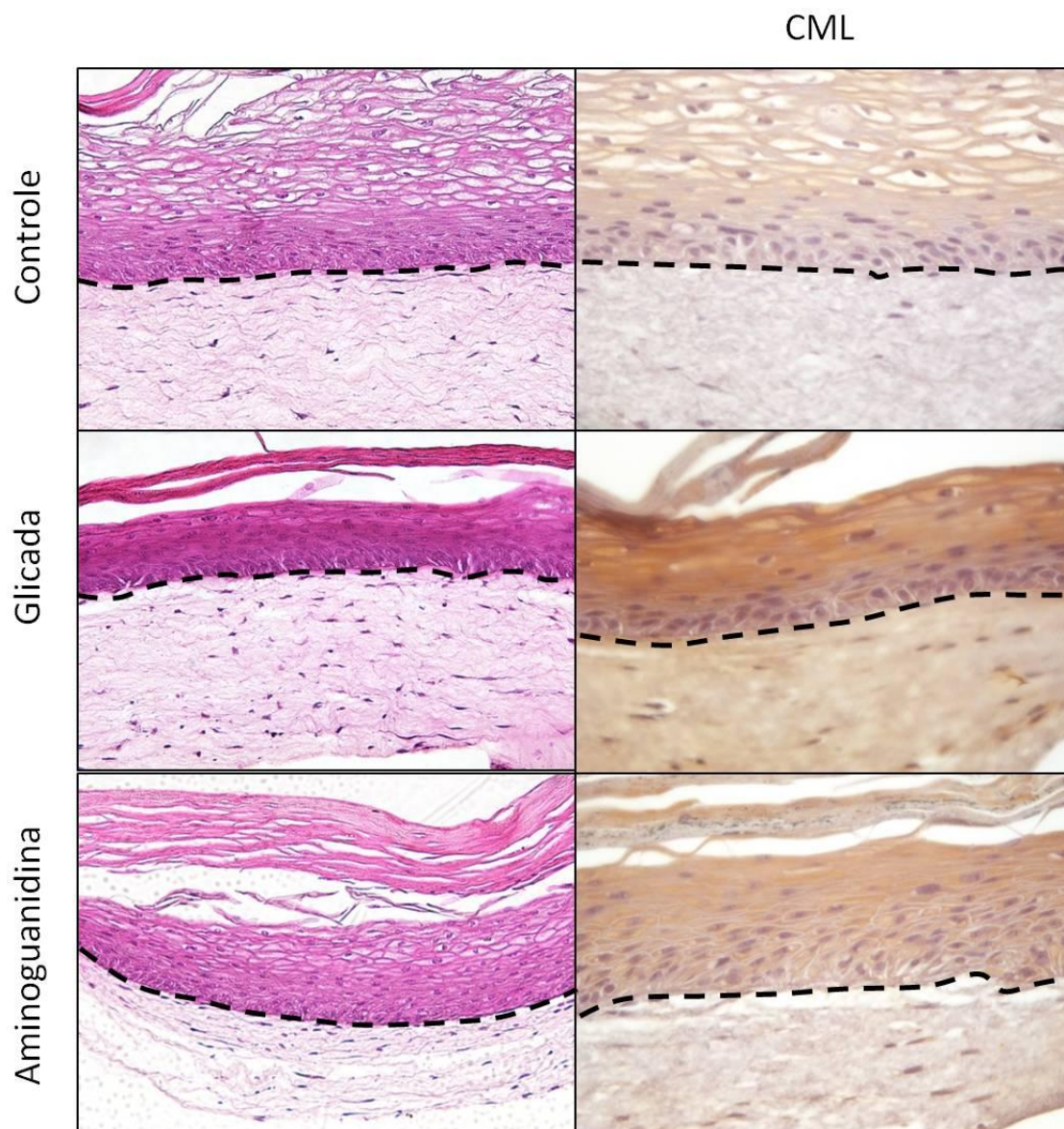


Figura 28. Fotomicrografia para marcação de CML. Pele reconstruída controle, glicada (glicoxilato de sódio) ou tratada com aminoguanidina 30mM, coradas com Hematoxilina-Eosina (1ª coluna) ou imunomarcadas para detecção de Carboximetil-lisina (2ª coluna). Aumento de 40x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). As linhas tracejadas se referem ao limite da membrana basal.

Observamos na **Figura 28**, segunda coluna, a imunomarcção evidente indicativa da presença de CML na pele glicada quando comparada à pele controle e à pele tratada com Ag 30mM, o que está de acordo com nossas expectativas e demonstra que a formação deste produto de glicação no colágeno solúvel perdura após a confecção da PHR e que o tratamento com a AG 30mM é capaz de prevenir a formação deste produto de glicação.

A fim de investigar as alterações causadas nos fibroblastos pela glicação realizamos a imunomarcação de células mesenquimais, específicos para o filamento intermediário vimentina e para  $\alpha$ -actina de músculo liso (alfa-SMA, do inglês: *alpha smooth muscle actin*). Sabe-se que fibroblastos, células predominantes na derme, podem se transformar em miofibroblastos sob determinadas condições de estresse. Miofibroblastos são células encontradas subepitelialmente, que se encontram em estágio de diferenciação intermediário entre fibroblasto e célula muscular lisa. O papel desempenhado pelos miofibroblastos na cicatrização de feridas e remodelação patológica de alguns órgãos, bem como os mecanismos gerais de síntese de MEC e geração de forças de tensão têm sido descritos na literatura (Hinz et al, 2007). Essas células estão envolvidas na fibrose de muitos órgãos como fígado, pulmões e rins, atuando no enrijecimento tecidual por deposição de fibras de colágeno e na contração da cicatriz por contração intracelular concomitante ao tracionamento das fibras de colágeno. Após a cicatrização estar completa, os miofibroblastos geralmente entram em apoptose. Acredita-se que várias doenças fibróticas decorram da persistência dos miofibroblastos devido à falha dessas células de entrarem em apoptose. O mesmo ocorre na formação de quelóides decorrentes da cicatrização de feridas. Miofibroblastos podem ter múltiplas origens, no entanto, o seu desenvolvimento segue uma sequência bem estabelecida de eventos. Em condições normais, os fibroblastos exibem pouca ou nenhuma actina associada aos contatos célula-matriz ou célula-célula e pouca produção de MEC. Após uma lesão no tecido, eles são ativados e migram para o local do dano através da quimiotaxia exercida pelas citocinas liberadas pelas células inflamatórias ou residentes, sintetizando componentes da matriz (Hinz et al, 2007).

Os fibroblastos são geralmente protegidos do estresse pela MEC em condições normais. Quando esta estrutura de proteção é perdida ou alterada devido à injúria ou

alterações conformacionais como, por exemplo, o *crosslink* das fibras gerado pela glicação a biotransformação pode ser ativada (Tomasek et al, 2002). Sabe-se que o fibroblasto pode ser identificado por meio do marcador para vimentina ou, no caso de miofibroblastos, com o marcador alfa-SMA. Desta forma investigamos a biotransformação dos fibroblastos em miofibroblastos.

A Vimentina é uma proteína expressa em células de origem mesenquimal e geralmente não é expressa por queratinócitos em condições normais (Biddle & Spandau, 1996). Entretanto sabe-se que células obtidas de alguns tipos de tumores cutâneos podem demonstrar expressão tanto de citoqueratinas quanto de vimentina (Azumi & Battifora, 1987; McNitt et al, 1985). Sabe-se também que alguns tipos de células epiteliais cultivadas *in vitro* também podem co-expressar citoqueratinas e vimentina (Hake & Lane, 1989; Pieper et al, 1992; Richard et al, 1990), entretanto a importância desta co-expressão ainda é pouco elucidada.

A alfa actina de músculo liso é uma proteína expressa em grandes quantidades pelos miofibroblastos, estas células têm atividade contráctil e desempenham importante papel na cicatrização de feridas. Durante a recuperação após injúria alguns fibroblastos podem adquirir características morfológicas e bioquímicas de células musculares lisas, os miofibroblastos. Estes participam da síntese da MEC e manutenção da força mecânica de tração, o que resulta na organização da matriz e contração de feridas (Amadeu et al, 2003; Tomasek et al, 2002).

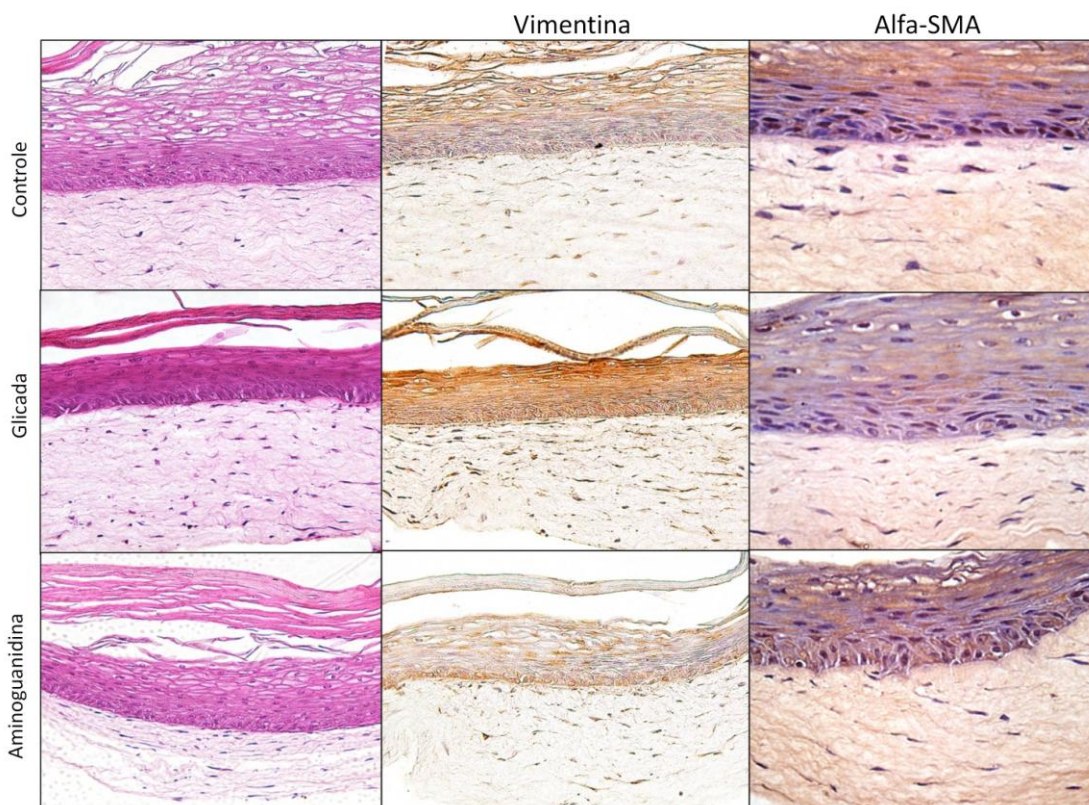


Figura 29. Fotomicrografia para marcadores Vimentina e alfa-SMA. Pele reconstruída controle, glicada (gloxilato de sódio) ou tratada com aminoguanidina 30mM, coradas com Hematoxilina & Eosina (1ª coluna) ou imunomarcadas para detecção de Vimentina (2ª coluna) ou Alfa-SMA (3ª coluna). Aumento de 20x. Experimento realizad em triplicata biológica (n=3 por grupo).

De acordo com estudos de Biddle e Spandau (1996), quando os queratinócitos em cultura tendem a se diferenciar, fato comprovado através da maior expressão de involucrina e de algumas citoqueratinas, a expressão de vimentina é perdida. Os resultados do estudo em questão sugerem que a expressão da vimentina pelos queratinócitos possa ser importante para a motilidade e junções célula-célula na MEC durante processos de cicatrização. No entanto, o grupo não conseguiu encontrar correlação entre a expressão da vimentina com a proliferação celular, já que, mesmo suprimindo a proliferação dos queratinócitos pela adição de TGF $\beta$  no meio, a expressão de vimentina permanece inalterada.

Conforme observamos na **Figura 29**, coluna central, a expressão de vimentina foi aumentada tanto nos fibroblastos na derme, conforme o esperado, quanto nos

queratinócitos na epiderme, na pele glicada. Isso nos indica que a glicação alterou de alguma forma o padrão de expressão proteica destas células. O que corrobora com os dados demonstrados na **Figura 27**, onde percebemos claramente que nas peles glicadas os queratinócitos se mantêm expressando a citoqueratina 14, indicativo de epitélio menos diferenciado, mesmo nos estratos superiores.

À partir dos resultados encontrados com a expressão de vimentina pelos fibroblastos, partimos para investigação quanto à possível transformação destas células para miofibroblastos como forma de manter a tração da derme alterada pelo “*crosslink*” das fibras colagênicas devido à glicação. Para tanto utilizamos o anticorpo anti-alfa-SMA. Ao contrário do que esperávamos não houve maior expressão desta proteína nos fibroblastos das dermes glicadas, conforme **Figura 29** - 3ª coluna, o que nos sugere que a intensa alteração morfológica dos fibroblastos não se deva à biotransformação para miofibroblastos, sendo necessária investigação mais profunda sobre as causas das alterações fenotípicas observadas. Uma descrição detalhada das alterações morfológicas dos fibroblastos frente à glicação foi realizada pela Doutora Maíra Estanislau Soares de Almeida em sua tese de obtenção do título de doutor, recentemente defendida (Almeida, 2015).

Avaliamos também se a glicação seria capaz de alterar o padrão de adesão célula-célula no epitélio, para tanto fizemos a imunomarcação para E-caderina e Desmogleína. As caderinas são moléculas de adesão dependentes do cálcio que permitem a ligação entre células vizinhas, sendo a E-Caderina a mais abundante em epitélios. As desmogleínas são proteínas relacionadas à adesão célula-célula constituintes dos filamentos gerados pelas desmoplaquinas, essas por sua vez são proteínas que constituem os desmossomos, ou junções celulares.

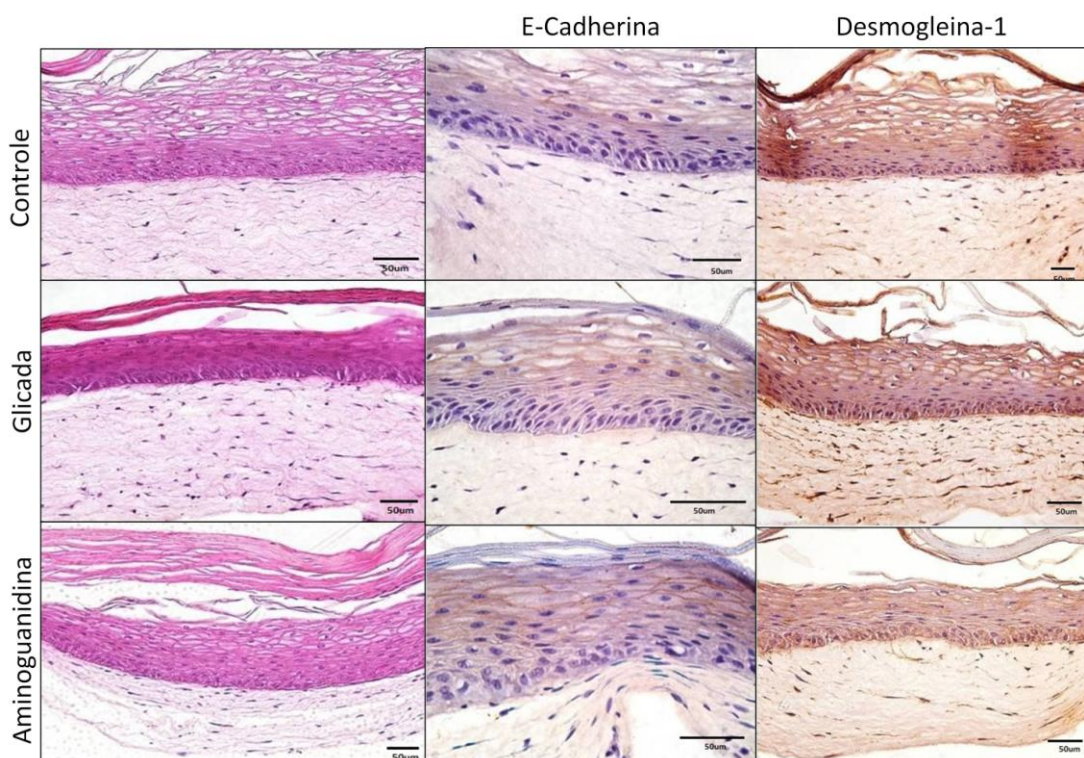


Figura 30. Fotomicrografia para marcadores E-Caderina e Desmogleína. Pele reconstruída controle, glicada (glicolato de sódio) ou tratada com aminoguanidina 30 mM, coradas com Hematoxilina & Eosina (1ª coluna), imunomarcadas para detecção de E-caderina (2ª coluna) ou desmogleína (3ª coluna). Aumento de 20x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo)

Como se pode observar na **Figura 30**, ocorreu uma aparentemente elevação na expressão de E-caderina na pele glicada em relação à pele controle, o tratamento da pele com AG aparentemente não foi capaz de manter a expressão da E-Caderina próximo a controle, se assemelhando mais a grupo glicado. O mesmo não pôde ser observado para a desmogleína-1, cuja expressão aparentemente não foi alterada pela glicação. A análise de expressão de E-caderina e desmogleína-1 foi confirmada por ensaio de PCR real time, como será demonstrado mais adiante.

Realizamos também o ensaio para detecção de DNA fragmentado nas peles geradas, indicativo de dano tecidual. Os resultados estão apresentados na **Figura 31**, abaixo.

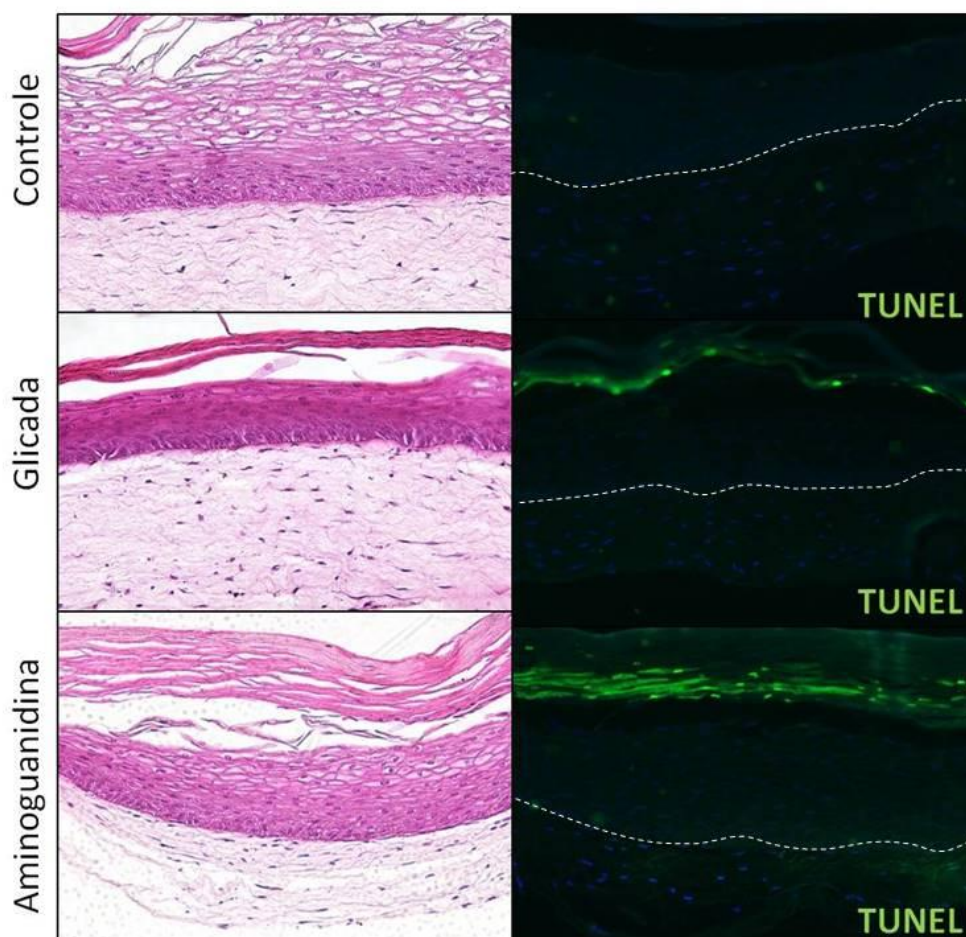


Figura 31. Fotomicrografia para marcador de DNA fragmentado, TUNEL. Pele reconstruída controle, glicada (glioxilato de sódio) ou tratada com aminoguanidina 30 mM, coradas com Hematoxilina & Eosina (1ª coluna) ou imunomarcadas para detecção de DNA fragmentado (2ª coluna). Aumento de 20x. Experimento realizado em triplicata biológica (n=3 por grupo). A linha tracejada representa a divisão entre derme e epiderme.

Observamos na **Figura 31** que houve maior quantidade de DNA fragmentado nas peles glicadas e glicadas tratadas com AG comparadas às peles controle. Uma pele controle incubada com DNase I foi utilizada como controle positivo a fim de garantir a eficácia da reação (dados não mostrados). Observamos que a presença do DNA fragmentado se deu principalmente nas camadas mais diferenciadas da epiderme, indicando apoptose dos queratinócitos neste extrato celular. Não foram observadas, no entanto, sinais de apoptose entre os fibroblastos, o que contraria nossas expectativas, já que a glicação causa diminuição de proliferação e apoptose nestas células (Pageon et al, 2014).



#### 4.9 Análise da geração de AGEs nas peles reconstruídas

A fim de confirmar a expressão das AGEs nas peles reconstruídas glicadas, já indicadas pela análise de imunohistoquímica para a detecção do AGE CML, realizamos o imunoenensaio colorimétrico de detecção dos AGEs totais no lisado tecidual conforme demonstrado na **Figura 32** abaixo.

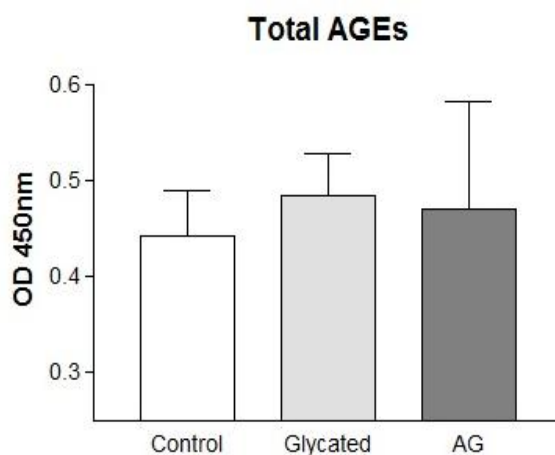


Figura 32. AGEs totais em lisado de pele (via ELISA). Experimento realizado em triplicata experimental (n=6 por grupo).

Como podemos observar na **Figura 32** acima, houve uma tendência de elevação da expressão de AGEs totais nas peles glicadas em comparação às peles controle via imunoenensaio colorimétrico (ELISA). No entanto, devido ao grande desvio padrão entre as repetições do ensaio, essa elevação não foi estatisticamente significativa. O que nos levou a crer que o produto de glicação mais representativo na pele reconstruída glicada, seja a CML, conforme dados obtidos por imunohistoquímica (**Figura 28**).

Partimos então para a análise de expressão da CML via *western blotting* na derme ou epiderme das peles (separadas mecanicamente com auxílio de pinças). Essa separação derme e epiderme se fez necessária devido ao interesse de investigação quanto ao compartimento da pele mais afetado pelos efeitos da glicação, já que

observamos um efeito interessante de marcação de CML nas epidermes, investigado via técnica de imunomarcção (Figura 28).

Os resultados apresentam-se na Figura 33, abaixo, em conjunto com a imagem de imunomarcção para o mesmo anticorpo (anti-CML) a fins de comparação.

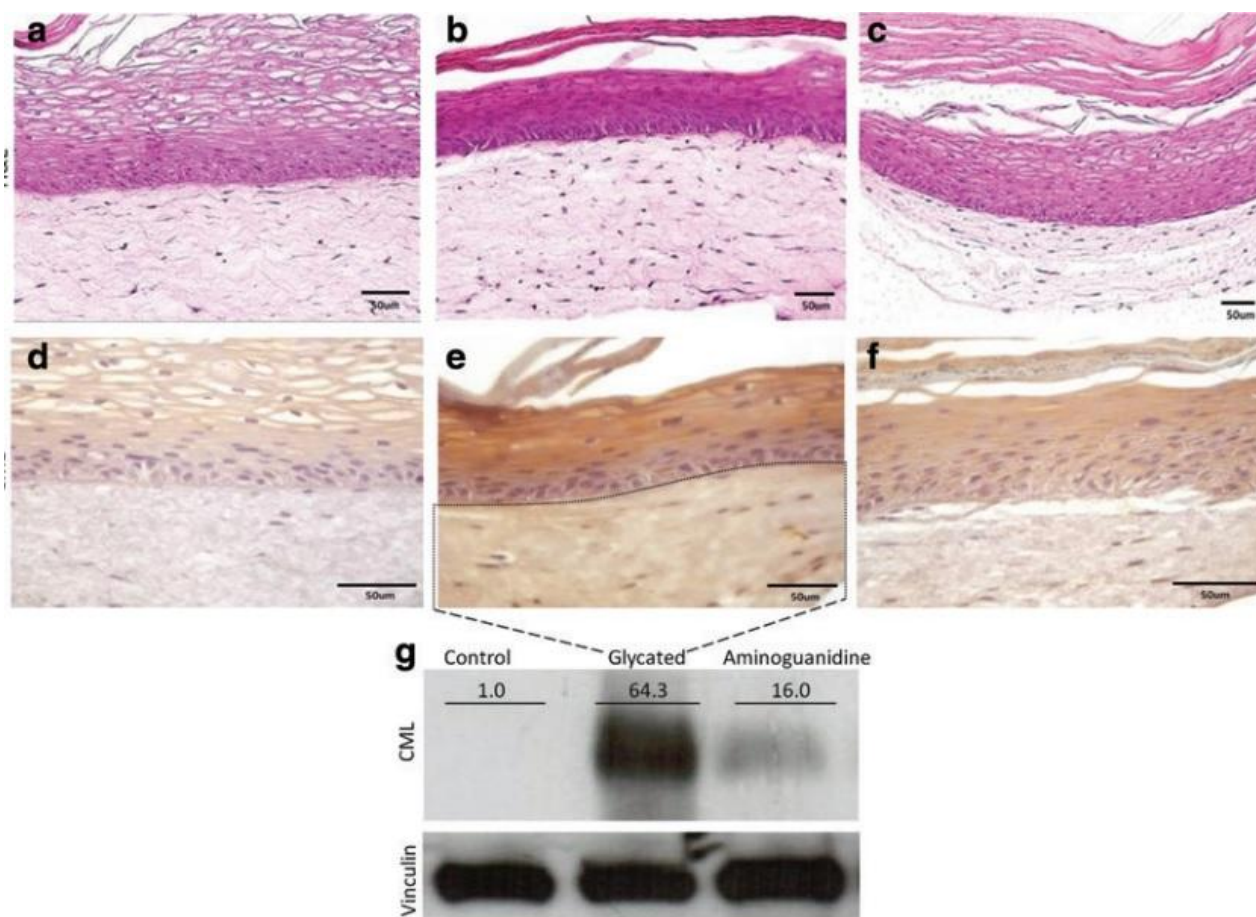


Figura 33. Expressão de CML na epiderme das peles reconstruídas. A, B e C: morfologia da PHR, coloração por Hematoxilina & Eosina. D, E e F: Imunomarcção para CML. G: Western blotting para CML. Experimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo), quantificação das bandas realizada pelo software *Image J*.

Como observado na Figura 33, acima, houve uma elevação da marcação de CML nas dermes glicadas em comparação com as dermes controle. O tratamento com AG demonstrou significativa redução nos níveis de marcação da CML. Esses dados estão de acordo com nossas expectativas já que a reação de glicação foi realizada sobre o colágeno, constituinte do compartimento dérmico.

Porém, de forma surpreendente em comparação aos achados da imunohistoquímica, não encontramos valores significativos da expressão de CML na epiderme (dados não mostrados), para a qual não houve formação de bandas no filme de raio X, o que pode ser explicado pela dosagem proteica total da epiderme ser muito superior a da derme, o que reduziu a quantidade da fração de proteína de interesse, CML, carregada no gel de eletroforese, mesmo nas condições máximas de carregamento protéico/volume de amostra por poço do gel.

#### 4.10 *Análise da expressão gênica via PCR para: Citoqueratinas 10 e 14, Desmogleína e E-Caderina.*

Após as análises das imagens de imunohistoquímica para as proteínas epiteliais de interesse: CK10, CK14, E-caderina e desmogleína-1, partimos então para a análise quantitativa da expressão gênica dessas proteínas por PCR. Os painéis foram montados em conjunto com as análises de imunohistoquímica já apresentadas para uma melhor visualização.

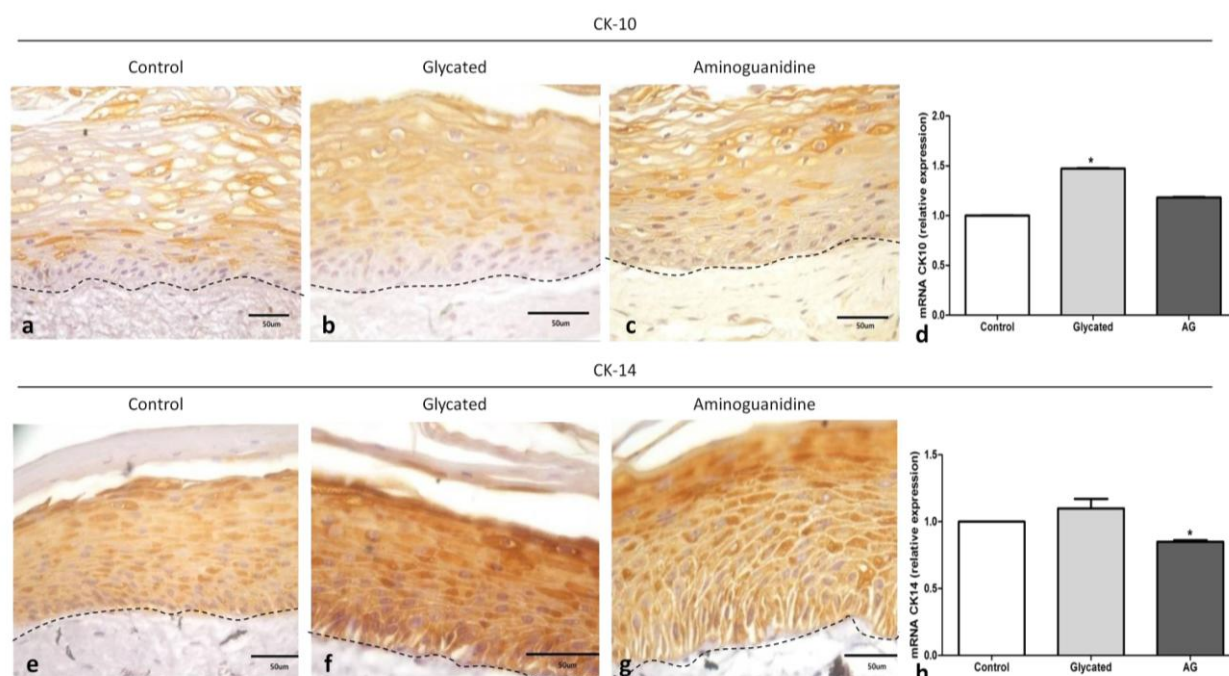


Figura 34. Expressão gênica dos marcadores de diferenciação epitelial CK-10 e CK-14. Eperimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo). (\* $p < 0,05$ ). As linhas tracejadas se referem ao limite da membrana basal.

Sabe-se que a expressão de CK10 ocorre majoritariamente no citoplasma de queratinócitos bem diferenciados, nos extratos intermediários e superiores da epiderme, demonstrando maturação tecidual (Brohem et al, 2011). Observamos na **Figura 34** um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão da citoqueratina 10 nas peles glicadas. Também observamos uma tendência de elevação na expressão da citoqueratina 14, indicativa dos extratos mais basais e proliferativos do epitélio, devido à glicação.

Em condições normais a CK14 é expressa em maior quantidade pelas células proliferativas, somente próximas à camada basal (Brohem et al, 2011). Entretanto, no epitélio glicado as células mantêm esse perfil proliferativo mesmo nas camadas mais superiores como indicado nas figuras de imonhistoquímica, tamém observado na análise por PCR.

A fim de verificar o padrão de adesão célula-célula na glicação realizamos análises de imunohistoquímica para detecção de E-Caderina e desmogleína dos cortes de peles reconstruídas, conforme já demonstrado e confirmamos esses dados por análise de PCR.

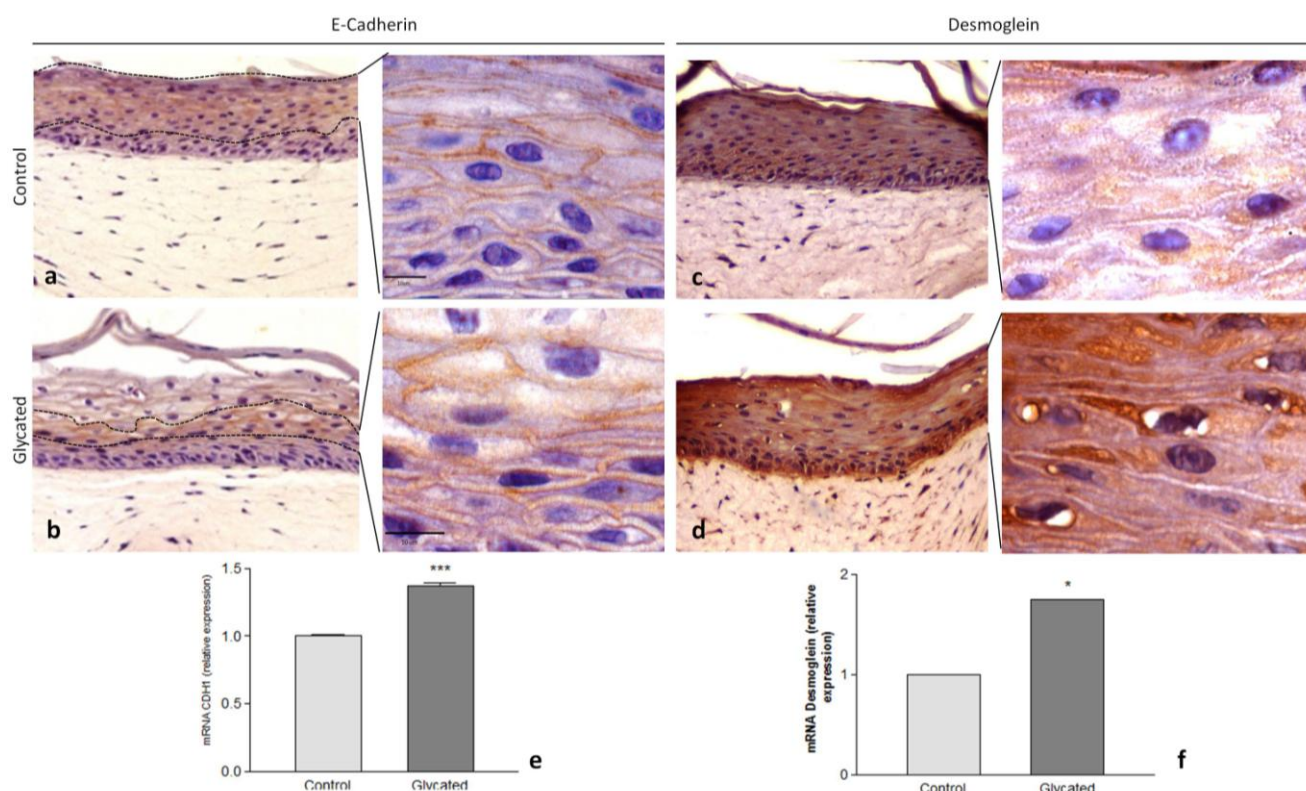


Figura 35: Expressão gênica dos marcadores de adesão celular E-caderina e desmogleína-1. Experimento realizado em triplicata experimental (n=3 por grupo). (\*p<0,05) (\*\*p<0,01) (\*\*\*)p<0,001).

Caderinas são moléculas de adesão cálcio-dependentes que são responsáveis pelas interações entre as células. A E-Caderina é a caderina mais abundante no epitélio.

Podemos observar na **Figura 35**, acima, que a glicação causou uma elevação significativa na expressão dessa proteína. Desmogleínas são proteínas relacionadas à adesão célula-célula, e constituintes dos filamentos gerados pelas desmoplaquinas, que são proteínas formadoras dos desmossomos, ou junções celulares, observamos que a glicação elevou a expressão da desmogleína.



Tabela 6: Resumo dos resultados alcançados.

	<b>Controle</b>	<b>Glicada</b>	<b>Aminoguanidina</b>
<b>Morfologia (H&amp;E)</b>	Peles altamente diferenciadas, células saudáveis	Menor diferenciação epitelial, células vacuolizadas	Diferenciação epitelial semelhante às peles controle
<b>Trama colagênica (SHG)</b>	Trama distribuída de forma homogênea	“ <i>Crosslink</i> ” das fibras, perda do padrão regular e maior compactação do colágeno	Perda do padrão regular, porém com menor compressão das fibras
<b>Diferenciação Epitelial (IHQ - CK 10 e CK14)</b>	Células proliferativas próximas à camada basal e células maduras nos extratos superiores	Expressão intensa de CK14 (células proliferativas) em toda a extensão epitelial	Expressão moderada de CK14 em todo o epitélio
<b>Adesão célula-célula no epitélio (IHQ)</b>	Expressão de E-Caderina e Desmogleína regular	Expressão de E-Caderina e Desmogleína levemente aumentada	Expressão de E-Caderina e Desmogleína regular à aumentada
<b>Proliferação celular (IF)</b>	Marcação para proliferação celular (BrdU) de forma específica entre as células	Marcação intensa para BrdU, inclusive nos extratos superiores	Marcação moderada, próxima aos extratos mais basais
<b>Produtos de Glicação – CML (IHQ)</b>	Ausente	Marcação para CML intensa na derme e epiderme	Marcação para CML moderada na epiderme
<b>Produtos de Glicação – CML (Western blot)</b>	Ausente	Expressão significativamente superior na derme	Expressão intermediária entre controle e glicada
<b>Citoesqueleto – Vimentina (IHQ)</b>	Expressão discreta na epiderme	Expressão evidenciada nos fibroblastos na derme e em toda a epiderme	Expressão discreta na camada basal da epiderme
<b>Fragmentação de DNA – Apoptose (IF)</b>	Ausência de marcação de DNA fragmentado	Marcação evidenciada nos extratos superiores da epiderme	Marcação intensa nos extratos superiores da epiderme

Fonte: do autor

## 5. CONCLUSÃO

A reconstrução da pele humana no Laboratório de Citopatologia, FCF-USP, vem sendo aprimorada nos últimos 10 anos, e o modelo foi utilizado para estudos em diversos campos da ciência, entre eles o estudo do melanoma metastático humano, a avaliação de eficácia de fármacos, reconstrução de modelos de pele imunocompetente para ensaios de irritação e sensibilização, avaliação de segurança de compostos farmacológicos e cosméticos, interação com patógenos, modelos de enxertia (reconstrução timpânica), avaliação de potencial de moléculas despigmentantes, entre outros. Durante os experimentos descritos nesta tese de doutorado padronizamos uma nova aplicabilidade ao nosso modelo, por meio da reconstrução de uma pele envelhecida (ou diabética) modificada pela glicação.

O modelo de PHR envelhecida (ou diabética) foi implementado de forma bem sucedida e demonstrou responder adequadamente ao tratamento com a molécula conhecidamente antiglicante aminoguanidina. Entre os achados descritos, destacamos a

grande geração do produto de glicação carboximetilisina na epiderme, fato inédito na literatura para modelos *in vitro*, conforme indicado em nossa publicação (anexa a esta tese).

Contribuímos, portanto, para o desenvolvimento de uma metodologia alternativa ao uso animal, passível de ser reproduzida e utilizada pelos centros de pesquisa acadêmica e industriais para avaliação da eficácia e segurança de agentes cosméticos, além de outras aplicações como, por exemplo, estudos da biologia celular e tecidual no envelhecimento causado pela glicação das proteínas, efeitos de medicamentos nesta pele alterada pelos AGEs, modelos de pigmentação diferencial da pele idosa, avaliação de invasão do melanoma através da MEC glicada, cujos ensaios piloto já foram realizados em nosso laboratório.

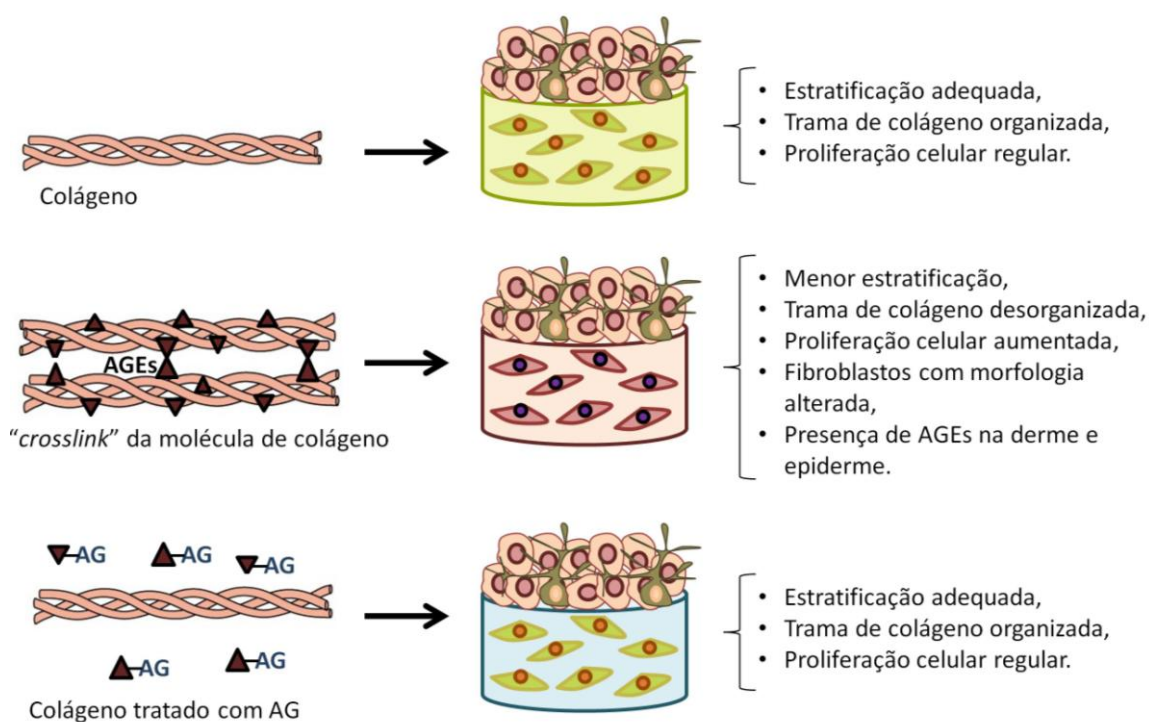


Figura 37. Resumo das características da PHRs. Fonte: do autor.



## 6. PRODUÇÃO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA

No período referente ao doutorado os resultados foram apresentados na forma de pôster em congressos e também foram ministradas aulas e palestras, atividades listadas abaixo, cujos certificados e/ou comprovantes apresentados nos documentos anexos.

### 6.1 *Participação em Congressos*

- a) Collagen glycation to generate skin reconstructed mimicking aged and diabetic skin in vitro. **Paula Comune Pennacchi**, Maira Estanislau Soares de Almeida, Maria Clara Crepaldi, Marinilce Fagundes dos Santos, Silvy Stuchi Maria-Engler. 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, Rio de Janeiro, Brasil, 2012.
- b) Desenvolvimento de Pele Humana Artificial para a Prospecção de Novos Fármacos e Cosméticos. **Paula Comune Pennacchi**, Silvia Stuchi Maria-Engler, Silvia Berlanda de Moraes Barros. I Feira de Inovação e Empreendedorismo da USP, São Paulo, Brasil, 2012.
- c) Collagen glycation to generate skin reconstructed mimicking aged and diabetic skin in vitro. **Paula Comune Pennacchi**, Maira Estanislau Soares de Almeida, Maria Clara Crepaldi, Marinilce Fagundes dos Santos, Silvy Stuchi Maria-Engler. XXVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da USP, São Paulo, Brasil, 2012.
- d) Avaliação da Citotoxicidade de Compostos Anti-Glicação em Células de Pele Humana. Maria Clara de Araújo Crepaldi, **Paula Comune Pennacchi**, Sylvia Stuchi Maria-Engler. XX Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP SIICUSP, Ribeirão Preto, Brasil, 2013.
- e) Aged Skin Model with Glycated Dermis as Platform to Evaluate Anti-Glycation Compounds. **Paula Comune Pennacchi**, Maria Clara Crepaldi, Octávio Luís Gomes, Maira Estanislau Soares de Almeida, Marinilce Fagundes dos Santos, Silvy Stuchi Maria-Engler. Gordon Research Conferences: Epithelial Differentiation & Keratinization, Barga (Lucca), Itália, 2013.
- f) Aged Skin Model with Glycated Dermis as Platform to Evaluate Anti-Glycation Compounds. **Paula Comune Pennacchi**, Maria Clara Crepaldi, Octávio Luís Gomes, Maira Estanislau Soares de Almeida, Marinilce Fagundes dos Santos,

Silvy Stuchi Maria-Engler. 48ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, São Paulo, Brasil, 2013.

- g) Artificial Skin in Perspective of Alternative Methods to Animal Experimentation in Brazil. Silvy Stuchi Maria-Engler, Ana Paula Immich, Andrea Costa Fruet, Bianca Ferrucio, Carolina Motter Catarino, Debora Kristina Alves, Fernanda Flores, Kely Turra, Maria Clara Crepaldi, Luiz Henrique Catalani, Manoela Tiago dos Santos, Natalia Tamachiro, Octavio Luís Alves Gomes, Patricia Casari, **Paula Comune Pennacchi**, Renato Ramos Massaro, Tatiana Pedrosa, Silvia Romano, Silvana Sandri, Thalita Boldrin Zanoni, Silvia B.M. Barros. Future Tox II: In vitro data and in silico models for predictive toxicology. January 16-17, 2014, Fryday Center at the University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, 2014.
- h) Generation of in vitro aged skin. **Paula Comune Pennacchi**, Máira Estanislau Soares de Almeida, Octávio Luís Alves Gomes, Fernanda Faião Flores, Maria Clara de Araújo Crepaldi, Marinilce Fagundes dos Santos, Silvia Berlanga de Moraes Barros, Silvy Stuchi Maria-Engler. XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2015.
- i) Generation of in vitro aged skin. **Paula Comune Pennacchi**, Máira Estanislau Soares de Almeida, Octávio Luís Alves Gomes, Fernanda Faião Flores, Maria Clara de Araújo Crepaldi, Marinilce Fagundes dos Santos, Silvia Berlanga de Moraes Barros, Silvy Stuchi Maria-Engler. The 2015 ASCB Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 12-16 de dezembro de 2015.

## 6.2 *Atividades Didáticas*

### 6.2.1 Visita Técnica

- a) Visita técnica ao Laboratório de Derme e Envelhecimento do Centro Charles Zviak de Pesquisa e Inovação da L'Oréal, em Clichy, França, sob coordenação do Professor Doutor Daniel Asselineau e Doutor Hervé Pageon, em maio de 2013.
- b) Visita técnica ao Instituto Español del Calzado y Conexas INESCOP, e ao laboratório de cultura de células da pele bovina para estudos da reconstrução *in vitro* de couro bovino, em Elda, Espanha, em março de 2015.

### 6.2.2 Aulas Ministradas

- a) Aula ministrada no IX SEBIO - Semana Acadêmica da Biologia da FEPI, na cidade de Itajubá-MG, com o tema: “Desenvolvimento de Pele Reconstruída para a Prospecção de Novos Fármacos” 2012.
- b) Aula ministrada na disciplina da Pós Graduação em Ciências, no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu-SP, com o tema: “A Cultura Celular e a reconstrução de Pele Humana para a Prospecção de Novos Fármacos” 2013.
- c) Aula ministrada no Curso de Extensão da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, voltado ao público da Terceira Idade, com o tema “Bioengenharia” 2013.
- d) Palestra ministrada no Instituto Español del Calzado y Conexas INESCOP, com o tema “Reconstructed Human Skin in perspective of alternative methods to animal experimentation, Reasons to invest in alternative methods” em Elda, Espanha, 2015.
- e) Aula ministrada na Semana de Ciências da Vida, no Instituto de Biologia e Agromonia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Ilha Solteira-SP, com o tema: “A Cultura Celular e a reconstrução de Pele Humana para a Prospecção de Novos Fármacos” 2015.

### 6.3 *Colaborações em Projetos de Pesquisa*

- a) Pesquisadora integrante do Projeto RENAMA-CNPq-MCTI (403252/2012-0), sobre Peles Reconstruídas como Métodos Alternativos à Experimentação Animal (2012 - 2015), sob coordenação da Professora Doutora Silvy Stuchi Maria-Engler.
- b) Tese de Doutorado da aluna Gabrielli Brianezi, sob orientação do Professor Doutor Hélio Amante Miot, pela Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade do Estado de São Paulo UNESP (Processo FAPESP 12/05004-1).
- c) Tese de Doutorado do aluno Juan José Augusto Moyano Muñoz, sob orientação da Professora Doutora Silvia Regina Rogatto, do Laboratório NeoGene - Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do Hospital do Câncer A. C. Camargo (CAPES) pela Universidade Estadual Paulista UNESP, campus Botucatu-SP.
- d) Dissertação de Mestrado do aluno Dimitrius Tansini Pramio, e tese de Doutorado da aluna Érica Sara Souza de Araújo, sob orientação da Professora Doutora Ana Cristina Victorino Krepischi, pela Fundação Antônio Prudente, FAP, Brasil, no

Hospital do Câncer A. C. Camargo (Processos FAPESP 13/10785-5 e 12/13963-9), pela Universidade Estadual Paulista UNESP, campus Botucatu-SP.

- e) Projeto de Pós-doutorado da aluna Ana Paula Serafini Immich, orientada pelo Professor Doutor Luiz Henrique Catalani, diretor do Instituto de Química da USP, no Laboratório de Biomateriais Poliméricos, IQ-USP (Processo FAPESP 11/18017-1).
- f) Dissertação de mestrado da aluna Glenda de Figueiredo Sanches, sob orientação da Professora Doutora Leila Maria Lopes Bezerra da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CAPES).
- g) Membro integrante do Projeto de Auxílio FAPESP 11/14327-4 sobre o Desenvolvimento de pele artificial contendo equivalente dérmico glicado na avaliação da eficácia e toxicidade de compostos anti-glicação (2011 – 2013).
- h) Membro integrante do Projeto de Auxílio FAPESP 11/07441-7 sobre o Desenvolvimento de plataforma de pele artificial para avaliação de segurança (2011 – 2014).
- i) Colaborou no Projeto de Auxílio FAPESP 10/15919-1, sobre Migração e invasão tumoral mediadas pelo gene RECK em modelo de melanoma (2011 – 2014).

#### 6.4 *Colaboração em Projetos de Iniciação Científica*

- a) Maria Clara de Araújo Crepaldi. Avaliação da Citotoxicidade de Compostos anti-Glicação em Células de Pele Humana. Graduanda em Farmácia e Bioquímica na Universidade de São Paulo, bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2012.
- b) Maria Clara de Araújo Crepaldi. Avaliação de Toxicidade de Compostos anti-Glicantes em Pele Artificial Glicada. Graduanda em Farmácia e Bioquímica na Universidade de São Paulo, bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2013.
- c) Octávio Luís Alves Gomes. Desenvolvimento de Pele Artificial Glicada e Avaliação da Eficácia e Toxicidade de Compostos Anti-Glicação. Graduando em Farmácia e Bioquímica na Universidade de São Paulo, bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2013.
- d) Nayane de Souza. Estudo da inibição do potencial invasivo de linhagens de melanoma resistentes ao Vemurafenibe quando tratadas com o análogo da

curcumina DM-1. Graduanda em Química na Universidade Federal do ABC. Projeto enviado para análise de solicitação de bolsa PIBIC 2014.

- e) Gustavo Takashi Ikeda. Análise do perfil de morte celular do composto análogo da curcumina DM-1 em melanoma resistente ao vemurafenibel. Graduando em Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, projeto enviado à FAPESP para solicitação de bolsa de iniciação científica (FAPESP 2014/09788-2) 2014.
- f) Garcia Ferreira de Souza. Estudo do efeito antiproliferativo do butadieno push-pull clorado (C21) em cultura de células de melanoma humano. Graduando em Farmácia pela UNIBAN, estagiário no laboratório de Citopatologia, FCF-USP, trabalho de conclusão de curso, 2014.

#### 6.5 *Treinamento de Estudantes*

- a) Treinamento em técnicas de cultivo celular e geração de peles humanas artificiais da pós-doutoranda Ana Paula Immich, Instituto de Química – USP 2012-2014.
- b) Treinamento em geração de peles humanas artificiais da doutoranda Tatiana Pedrosa, do Departamento de análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da USP 2012-2013.
- c) Treinamento em técnicas de cultivo celular, ensaios de citotoxicidade e confecção de peles humanas artificiais da aluna de Iniciação Científica Maria Clara Crepaldi, graduanda em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da USP 2011-2013.
- d) Treinamento em técnicas de cultivo celular, confecção de peles humanas artificiais e técnicas de Imunomarcção e microscopia do aluno de Iniciação Científica Octávio Luís Gomes, graduando em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da USP 2012-2014.
- e) Treinamento na manutenção de queratinócitos humanos primários do doutorando Diogo Biagi do Instituto do Coração – InCor, da Faculdade de Medicina FMUSP 2013.
- f) Treinamento do mestrando Bruno Salles, do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Alfenas em técnicas de extração e purificação de colágeno tipo I obtido de tendões de cauda de rato, 2014.

- g) Treinamento em técnicas de cultivo celular e ensaios de citotoxicidade da aluna de Iniciação Científica Nayane de Souza, mestranda pelo Programa de Análises Clínicas da FCF-USP, 2014.
- h) Treinamento em técnicas de cultivo celular e ensaios de citotoxicidade do aluno de Iniciação Científica Gustavo Takashi Ikeda, graduando em Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP 2014.
- i) Treinamento em técnicas de cultivo celular e ensaios de citotoxicidade da aluna de Iniciação Científica Gabriela Cardoso, graduanda em Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP 2014.
- j) Treinamento em técnicas de cultivo celular e ensaios de citotoxicidade do estagiário Garcia Ferreira de Souza, graduando em Farmácia pela UNIBAN, estagiário no laboratório de Citopatologia, FCF-USP, 2014.

#### 6.6 *Manuscritos publicados ou em vias de publicação*

##### ***Manuscritos publicados:***

- a) **Pennacchi PC**, Almeida ME, Gomes OL, Faião-Flores F, Crepaldi MC, Dos Santos MF, Barros SB, Maria-Engler SS. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. Tissue Eng Part A. 2015.
- b) Discacciati MG, Gimenes F, **Pennacchi PC**, Faião-Flores F, Zeferino LC, Derchain SM, Teixeira JC, Costa MC, Zonta M, Termini L, Boccardo E, Longatto-Filho A, Consolaro ME, Villa LL, Maria-Engler SS. MMP-9/RECK imbalance: a mechanism associated with highgrade cervical lesions and genital infection by Human Papillomavirus (HPV) and Chlamydia trachomatis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 2015.
- c) de Araújo ES, Pramio DT, Kashiwabara AY, **Pennacchi PC**, Maria-Engler SS, Achatz MI, Campos AH, Duprat JP, Rosenberg C, Carraro DM, Krepschi AC. DNA Methylation Levels of Melanoma Risk Genes Are Associated with Clinical Characteristics of Melanoma Patients. Biomed Res Int., 2015.
- d) Tiago M, de Oliveira EM, Brohem CA, **Pennacchi PC**, Paes RD, Haga RB, Campa A, de Moraes Barros SB, Smalley KS, Maria-Engler SS. Fibroblasts protect melanoma cells from the cytotoxic effects of doxorubicin. Tissue Eng Part A. v. 20, n. 17-18, p. 2412-2421, 2014 [7 citações].

- e) de Souza Ferreira C, Araújo TH, Ângelo ML, **Pennacchi PC**, Okada SS, de Araújo Paula FB, Migliorini S, Rodrigues MR. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. Cell Biochem Funct. 2012 Oct; 30 (7):604-10. doi: 10.1002/cbf.2840. Epub 2012 May 20 [8 citações].
- f) de Souza Ferreira C, **Pennacchi PC**, Araújo TH, Taniwaki NN, de Araújo Paula FB, da Silveira Duarte SM, Rodrigues MR. Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils. Eur J Pharmacol. pii: S0014-2999(15)30440-4. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.044. Dec 24, 2015.

***Manuscritos submetidos, em fase de revisão:***

- a) Immich APS, **Pennacchi PC**, Naves AF, Boemo RL, Maria-Engler SS, Catalani L. Improved eardrum regeneration after myringoplasty surgery using biograft from co-culture of fibroblasts and keratinocytes grown on PLLA/PLGA electrospun membranes. Resubmitted to: Biomaterials, 19 June, 2015 (under review).
- b) Salles BCC, Taniguthi L, Ferreira JN, **Pennacchi PC**, Duarte SMS, Rodrigues MR, Silva MA, Brigagão MRPL, de Paula FA. Dry extract of *Passiflora edulis* reduces platelet aggregation in diabetic rats. Submitted to: Journal of Ethnopharmacology, 12 February, **2015** (under review).
- c) Pramio DT, **Pennacchi PC**, Maria-Engler SS, Campos AH, Duprat JP, Carraro DM, Krepischi ACV. LINE-1 methylation level associated with clinicopathological characteristics and mutational profile of cutaneous melanomas. Original Research submitted to: Journal: Frontiers in Genetics, section Epigenomics and Epigenetics (manuscript ID: 170249). Submitted on: 28 Sep 2015, interactive review started on: 14 Oct 2015.
- d) Zanoni TB, **Pennacchi PC**, Pedrosa TN, Maria-Engler SS. “Inducing the immune system using in vitro skin reconstructs: The next frontier in tissue engineering”. ID EBM-15-TI-IEM-0693, Journal: Experimental Biology and Medicine, submitted on: 9 Dec, 2015.

**6.7 Formação Complementar**

A aluna realizou recentemente (Setembro 2014 – Março 2015) período de doutorado sanduíche no Laboratório de Derme e Envelhecimento (“*Derme et Vieillessement*”) no *Research & Innovation Institute*, da L’Oréal, em Aulnay-sous-Bois, na

França sob supervisão do Dr. Hervé Pigeon e Dr. Daniell Asselineau, com projeto de pesquisa intitulado “Effects of specific Advanced Glycation End Products (CML and MG-H1) in papillary fibroblasts isolated from young x elderly donors” com foco na investigação de produtos de glicação (AGEs) sintéticos (CML e MG-H1) sobre as células da derme, fibroblastos papilares humanos, obtidos de pacientes de jovens ou idosos. Após essa primeira caracterização, via ensaios de toxicidade, liberação de interleucinas e metaloproteinases, o projeto avaliou os efeitos da idade do doador das células na reconstrução da pele completa, exposta aos produtos de glicação.

Durante o período de experimentos foi firmada parceria intelectual entre nosso laboratório no Brasil e os pesquisadores da L’Oréal acima citados com intenção de publicações científicas em conjunto. O relatório final apresentado ao Instituto de Pesquisa e Inovação da L’Oréal encontra-se anexo à esta tese.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, MU; Argirov OK; Minhas HS; Cordeiro CA; Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Ne- carboxymethyl- lysine- and Ne- (1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. Biochem. J. v. 364, p. 1-14, 2002.

AHMED, MU; Brinkmann Frye E; Degenhardt TP; Thorpe SR; Baynes JW. Ne-(carboxyethyl) lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with AGE in human lens proteins. Biochem. Journal, v. 324, p. 565-570, 1997

ALDINI G; Carini M; Beretta G; Bradamante S; Facino RM. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction? Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 298, p. 699–706, 2002.

ALHAMDANI MSS; Al-Azzawie HF; Abbas FKH. Decreased Formation of Advanced Glycation End-Products in Peritoneal Fluid by Carnosine and Related Peptides. Peritoneal Dialysis International. v. 27, n. 1, p. 86-89, 2007.

ALIKHANI M; Maclellan CM; Raptis M; Vora S; Trackman PC; Graves DT. Advanced Glycation end Products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP Kinases, and FOXO1 transcription factor. Am J Physiol Cell. V. 292, p. C850-C856, 2006.

ALMEIDA MES. Papel da glicação do colágeno I e da alta concentração de glicose sobre a migração de fibroblastos. 2015. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ALVES CA; Andion J; Brandão M; Menezes R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. v. 51, n. 7, p. 1050-1057, 2007.

AMADEU TP; Coulomb B; Desmouliere A; Costa AM. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. Lower extremity Wounds. V.2, p.60-68, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, Tyne, v. 34, n. 1, p. 62-69, 2011.



ARUOMA OI; Laughton MJ; Halliwell B. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? Biochem. J. v. 264, p. 863–869, 1989.

ASSELINÉAU D; Bernerd F; Fagot D; Pigeon H. Natural and photo-induced aging of the skin: the three dimensional culture approach. J Soc Biol. V. 197, n.1, p. 63-64, 2003.

AVERY NC; Bailey AJ. The effects of the Maillard Reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. Pathol Biol. V. 54, p. 387-395. 2006.

AZUMI N; Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. Am J Clin Pathol. V. 83, p. 286-296, 1987.

BAILEY AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. Mech. Ageing. Dev. v. 122, p.735-755, 2001.

BALASSUBRAMANI M; Kumar TR; Babu M. Skin substitutes: a review. Burns, v. 27, n. 5, p. 534-544, 2001.

BÉLISLE J; Zigras T; Costantino S; Cartier R; Butany J; Wiseman PW; Leask RL. Second harmonic generation microscopy to investigate collagen configuration: a pericarditis case study. Cardiovasc Pathol. v. 19, n. 4, p. 125-128, 2010.

BERNAUD C; Dickson RB; Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. Breast Cancer Res Treat, v. 50 (2), p. 97-116, 1998.

BERNERD F; Asselineau D. UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. Cell. Death. Differ., v. 5, p. 792-802, 1998.

BERNERD F; Vioux C; Asselineau D. Evaluation of the protective effect of sunscreens on in vitro reconstructed human skin exposed to UVB or UVA irradiation. Photochem. Photobiol., v. 71, p. 314-320, 2000.

BIDDLE D; Spandau DF. Expression of Vimentin in cultured human keratinocytes is associated with cell – extracellular matrix junctions. Arch Dermatol Res. V. 288, p. 621-624, 1996.

BISSEL MJ; Radisky DC; Rizki A; Weaver VM; Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. Differentiation, v. 70 (9-10), p. 537-546, 2002.

BISELL MJ; Hall HG; Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? J. Theor. Biol., v. 99, p. 31-68, 1982.

BOLDYREV AA; Dupin AM; Pindel EV; Severin SE. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. Com. Biochem. Physiol. v. 89, suppl. B, p. 245– 250, 1988.

BÖTTCHER-HABERZETH S; BiedermannT; Reichmann E. Tissue engineering of skin. Burns. v. 36, n.4, p. 450-460, 2010.

BRAVERMAN I. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus, Med. Clin. North Am. 55, 1019–1029, 1971.

BROHEM CA; Cardeal LB; Tiago M; Soengas MS; Barros SB; Maria-Engler SS. Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. Pigment Cell & Melanoma Research, v 24, n. 1, p. 35-50. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x. Epub 2010 Nov 9. 2011.

BROWNLEE, M. Glycation and diabetic complications. Diabetes, v. 43, p. 836–841, 1994.

BROWNLEE M; Vlassara H; Kooney A; Ulrich P; Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. Science, v. 232, p. 1629-1632, 1986.

BROWNLEE M; Cerami A; Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med, v.318, p. 1315–1321, 1988.

BRUMMER O; Böhmer G; Hollwitz B; Flemming P; Petry KU; Kühnle H. MMP-1 e MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation: an immunohistochemical study. Gynecol Oncol, v. 84 (2), p. 222-227, 2002.

CARRINO DA ; Onnerfjord P ; Sandy JD ; Cs-Szabo G ; Scott PG, et al. Agerelated changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. J Biol Chem v. 278, p. 17566–17572, 2003.

CHU SW, Tai SP, Chan MC, Sun CK, Hsiao IC, Lin CH, Chen YC, Lin BL. Thickness dependence of optical second harmonic generation in collagen fibrils. Opt Express. V. 15, n. 19, 12005-10, 2007

CORBETT JA ; Tilton RG; Chang K ; Hasan KS ; Ido Y ; Wang JL ; Sweetland MA ; Lancaster JR Jr; Williamson JR; McDaniel ML. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. Diabetes, v. 41, p. 552–556, 1992.

CORSTJENS H; Dicanio D; Muizzuddin N; Neven A; Sparacio R; Declercq L; Maes D. Glycation associated skin autofluorescence and skin elasticity are related to chronological age and body mass index of healthy subjects. Experimental Gerontology. v. 43, 663–667, 2008.

COX G; O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinases and cancer. Anticancer Res., v. 21 (6B), p. 4207-4219, 2001.

CRISAN D; Lupsor M; Boca A; Crisan M; Badea R. Ultrasonographic assessment of skin structure according to age. Indian J Dermatol Venereol Leprol v. 78, p. 519, 2012.

CRISAN M; Taulescu M; Crisan D; Cosgarea R; Parvu A. Expression of Advanced Glycation End-Products on Sun-Exposed and Non-Exposed Cutaneous Sites during the Ageing Process in Humans. PLoS ONE v. 8, n. 10, e75003, 2013.

DeCLERCK YA; Mercurio AM; Stack MS; Chapman HA; Zutter MM; Muschel RJ; Raz A; Matrisian LM; Sloane BF; Noel A; Hendrix MJ; Coussens L; Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the peth B study section. Am J Pathol. Review, v. 164 (4), p. 1131-1139, 2004.

DUNN J; McCance DR; Thorpe SR; Lyons TJ; Baynes JW. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. Biochemistry. V. 30, n. 5, p. 205-210, 1991.

DYER DG; Dunn JA; Thorpe SR; Bailie KE; Lyons TJ; McCance DR; Baynes JW. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. J. Clin. Invest., v. 91, p. 2463-2469, 1993.

EGEBLAD M; Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature reviews/Cancer, v. 2, p. 161-174, 2002.

EL GHALBZOURI A; Gibbs S; Lamme E; Van Blitterswijk CA; Ponc M. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. Br. J. Dermatol. v. 147, p. 230-243, 2002.

FERREIRA CS; Araújo TH; Ângelo ML; Pennacchi PC; Okada SS; de Araújo Paula FB; Migliorini S; Rodrigues MR. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. Cell Biochem Funct. 2012 Oct; 30 (7):604-10. doi: 10.1002/cbf.2840. Epub May 20, 2012.

FINE S; Hansen WP. Optical second harmonic generation in biological systems. Appl Opt. v. 10, n. 10, p. 2350-2353, 1971.

FISHER GJ; Kang S; Varani J; Bata-Csorgo Z; Wan Y; Datta S; Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch. Dermatol. v. 138, p. 1462-1470, 2002.

- FRESHNEY RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 6th Ed. New York: Alan R. Liss Inc. 732p, 2010.
- FREUND I.; Deutsch M. Second-harmonic microscopy of biological tissue. Opt Lett, v. 11, n. 2, p. 94, 1986.
- FULOP T; Larbi A; Douziech N. Insulin receptor and ageing. Pathol. Biol., Paris, v. 51, p. 574–580, 2003.
- GKOGKOLOU P; Böhm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging?. Dermato-Endocrinology. V. 4, n. 3, p. 1-12, 2012.
- GODIN B; Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. Adv. Drug. Deliv. Rev. v. 59, p. 1152-1161, 2007.
- GRINNELL F. Biochemical analysis of cell adhesion to a substratum and its possible relevance to cell metastasis. Prog. Clin. Biol. Res., v. 9, p. 227-236, 1976.
- GRINNELL F. Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices. J. Body. Mov. Ther. v. 12, p. 191-193, 2008.
- GROEBER F; Holeiter M; Hampel M; Hinderer S; Schenke-Layland K. Skin tissue engineering--*in vivo* and *in vitro* application. Adv. Drug. Deliv. Rev. v.63, n.4-5, p. 352-366, 2011.
- GRYKIEL KD; Zozulińska D ; Kostrzewa A. Increased expression of polymorphonuclear neutrophil surface receptors and serum L-selectin concentration in type 1 diabetic patients. Diab Res Clin Pract, Poznan, v. 74, n. 2, p. 349, Nov. 2000.
- HAAK AR; Lane AT. Retention of differentiated characteristics in human fetal keratinocytes in vitro. In Vitro, v. 25, p.59-600, 1989.
- HEHENBERGER K; Hansson A. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors. Cell Biochem Funct, vol. 15, no. 3, pp. 197-201, 1997.
- HINZ B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol. v, 127, p. 526–537, 2007.
- HINZ B; Phan SH; Thannickal VJ; Galli A; Bochaton-Piallat ML; Gabbiani G. The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. The American Journal of Pathology, v. 170, n. 6, p. 1807-1816, June, 2007.
- HIPKISS AR; Michaelis J; Syrris P; Kumar S; Lam Y. Carnosine protects proteins against in vitro glycation and cross-linking. Biochem. Soc. Trans. v. 22, suppl. 399, 1994.
- HIPKISS AR. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 30, p. 863-868, 1998.
- HIRSCH J; Baines CL; Feather MS. X-ray structure of 3-amino 5 substituted triazines produced by the reaction of 3-deoxyglucose with aminoguanidine. J. Carb. Res. v.11, p. 891-901, 1992.
- HOFMANN B; Adam AC; Jacobs K; Riemer M; Erbs C. Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? Exp Gerontol v. 48, p. 38–44, 2013.
- HOJILLA CV; Mohammed FF; Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. R J Cancer Review, v. 89 (10), p. 1817-1821, 2003).
- HORI M; Yagi M; Nomoto K; Ichijo R; Shimode A; Kitano T; Yonei Y. Experimental models for advanced glycation end products formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. Anti-aging Medicine. v.9, n.6, p. 125-134. 2012.
- HORNING JL; Sahoo SK; Vijayaraghavalu S; Dimitrijevic S; Vasir JK; Jain TK; Panda AK; Labhassetwar V. 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. Mol. Pharm. v. 5, p. 849-862, 2008.

- HOTAMISLIGIL GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature, Boston, v. 444, n. 7121, p. 860-867, Dec. 2006.
- HUNTLEY AC. The cutaneous manifestations of diabetes mellitus, J. Am. Acad. Dermatol. 7, 427–455, 1982.
- ICHIHASHI M; Yagi M; Nomoto K; Yonei Y. Glycation stress and photo-aging in skin. Anti-aging Medicine. v.8, p. 23-29, 2011.
- IKEDA K; Nagaia R; Sakamotoa T; Sanoa H; Arakic T; Sakatad N; Nakayamae H; Yoshidab M; Uedab S; Horiuchia S. Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. J. Immunol. Methods. v. 215, p. 95-104, 1998.
- IKEDA K; Higashi T; Sano H; Jinnouchi Y; Yoshida M; Araki T; Ueda S; Horiuchi S. Ne-(carboxymethyl)lysine protein adduct in a major immunological epitope in protein modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. Biochem. v. 35, p. 8075-8083, 1996.
- ITOH Y; Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. Essays Biochem, v. 38, p. 21-36, 2002.
- JEAN J; Bernard G; Duque-Fernandez A; Auger FA; Pouliot R. Effects of serum-free culture at the air-liquid interface in a human tissue-engineered skin substitute. Tissue Engineering. V. 17, n. 7-8, p.877-888, 2011.
- JEANMAIRE C; Danoux Pauly G. Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an in vivo and in vitro model study. British Journal of Dermatology. V. 145, p. 10-18, 2001.
- JIANG X; Zhong J; Liu Y; Yu H; Zhuo S; Chen J. Two-photon fluorescence and second-harmonic generation imaging of collagen in human tissue based on multiphoton microscopy. Scanning, v. 33, p. 53-56, 2011.
- JOLLIFFE IT. Principal Component Analysis. Springer Verlag. (2), 488, 2002.
- KAWABATA K; Yoshikawa H; Saruwatari K; Akazawa Y; Inoue T; Kuze T; Sayo T; Uchida N; Sugiyama Y. The presence of N $\epsilon$ -(Carboxymethyl) lysine in the human epidermis. Biochim Biophys Acta. v. 1814, p. 1246-1252, 2011.
- KEMPF K; Rose B; Herder C; Haastert B; Fusbahn-Laufenburg A; Reifferscheid A; Scherbaum WA; Kolb H; Martin S. The metabolic syndrome sensitizes leukocytes for glucose-induced immune gene expression. J Mol Med, Dusseldorf, v. 85, n. 4, p. 389-396, Apr. 2006.
- KESSENBROCK K; Plaks V; Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell, v. 2 (141-1), p. 52-67, 2010.
- KIKUCHI, S. et al. Glycation - a sweet tempter for neuronal death. Brain Res. Rev. v.41, p.306-323, 2003.
- KOEHLER MJ; König K; Elsner P; Bückle R; Kaatz M. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. Opt Lett. v. 31, p. 2879-2881, 2006.
- KOVACS D; Raffa S; Flori E; Aspite N; Briganti S; Cardinali G; Torrisi MR; Picardo M. Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. J Dermatol Sci v. 54, p. 106–113, 2009.
- LAPOLLA A; Traldi P; Fedele D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. Clin Biochem, Padova, v. 38, p. 103-115, Oct. 2004.
- LAVKER RM; Zheng P; Dong G. Aged skin: A study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. J Invest Dermatol 88, 44–51, 1987.
- LEWIS BS; Harding JJ. The effects of aminoguanidine on the glycation (non-enzymatic glycosylation) of lens proteins. Exp. Eye Res., v. 50, p.463-467, 1990.

- LI YM; Dickson DW. Enhanced binding of advanced glycation end production (AGEs) by ApoE4 isoform links the mechanism of plaque deposition in Alzheimer's disease. Neurosci Lett, New York, V. 22, p. 155-158, May 1997.
- LIAO H; Zakhaleva J; Chen W. Cells and tissue interactions with glycated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. Biomaterials. v. 30, p. 1689-1696, 2009.
- LIN CQ; Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB. J. v. 7, p. 737-743, 1993.
- LOWRY OH; Rosebrough NJ; Farr AL; Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. V. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MAILLARD LC. Actions des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. C. R. Soc. Biol. 1911.
- MARIA SS, Wada MLF. Cytochemical analysis of Vero cells on collagen gel in long term culture. In vitro Cell Dev Biol-Animal, v. 33, n. 10, p. 748-750, 1996.
- MAZLYZAM AL. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. Burns. v. 33, n. 3, p. 355-363, 2007.
- MAZZOLENI G; Di Lorenzo D; Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research? Genes Nutr. v. 4, p. 13-22, 2009.
- McFARLAND GA; Holliday R. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. Exp. Gerontol. v. 34, p. 35-45, 1999.
- McFARLAND GA; Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. Exp. Cell Res. v. 212, p. 167-175, 1994.
- McNUTT MA; Bolena JW ; Gowna AM ; Hammara SP ; Vogela AM. Coexpression of intermediate filaments in human epithelial neoplasms. Ultrastruct Pathol. V. 9, p. 31-43, 1985.
- MINE S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. PLoS ONE v. 3, n. 2, e4066, 2008.
- MONTAGNA W; Carlisle K. Structural changes in aging human skin. J Invest Dermatol v. 73, p. 47-53, 1979.
- NAGAI R; Mori T; Yamamoto Y; Kaji Y; Yonei Y. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. Anti-Aging Medicine. v. 7, p. 112-119, 2010.
- NENNA A; Nappi F; Singh SSA; Sutherland FW; Di Domenico F; Chello M; Spadaccio C. Pharmacologic Approaches Against Advanced Glycation End Products (AGEs) in Diabetic Cardiovascular Disease. Res Cardiovasc Med. V. 4, n. 2, e26949, 2015.
- NORTON GR; Candy G; Woodiwiss AJ. Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. Circulation, Johannesburg, v. 93, p. 1905-1912, May 1996.
- PAGEON H; Bakala H; Monnier VM; Asselineau D. Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro. Eur J Dermatol. v.17, n. 1, p.12-20. 2007.
- PAGEON H; Asselineau D. An in vitro approach to the chronological aging of skin by glycation of the collagen: the biological effect of glycation on the reconstructed skin model. Ann. N. Y. Acad. Sci. v. 1043, p. 529-532, 2005.

PAGEON H; Técher M; Asselineau D. Reconstructed skin modified by glycation of the dermal equivalent as a model for skin aging and its potential use to evaluate anti-glycation molecules. Experimental Gerontology. V. 43, p. 584-588, 2008.

PAGEON H; Zucchi H, Rousset F, Monnier VM; Asselineau D. Skin aging by glycation: lessons from the reconstructed skin model. Clin Chem Lab Med, v. 52, n. 1, p. 169–174, 2014

PAGEON H; Zucchi H; Dai Z; Sell DR; Strauch CM; Monnier VM; Asselineau D. Biological Effects Induced by Specific Advanced Glycation End Products in the Reconstructed Skin Model of Aging. BioResearch Open Access v. 4, n. 1, p. 54-64, 2015.

PASONEN-SEPPÄNEN S; Suhonen TM; Kirjavainen M; Miettinen M; Urtti A; Tammi M; Tammi R. Formation of permeability barrier in epidermal organotypic culture for studies on drug transport. J. Invest. Dermatol. v. 117, p. 1322-1324, 2001.

PAUL RG; Bayley AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. Int J Biochem Cell Biol, Langford, v. 28, n. 12, p. 1297-1310, Dec. 1996.

PENA AM; Strupler M; Boulesteix T; Schanne-Klein MC. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy. Optics Express. V. 13, n. 16, p. 6268-6274, 2005.

PENNACCHI PC, Almeida ME, Gomes OL, Faião-Flores F, Crepaldi MC, Dos Santos MF, Barros SB, Maria-Engler SS. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. Tissue Eng Part A. V. 21, n. 17-18, 2015.

PEREIRA RF ; Barrias CC ; Granja PL ; Bartolo PJ. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. Nanomedicine. v. 8, n. 4, p. 603-621, 2013.

PEREZ MI; Kohn SR. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus, J. Am. Acad. Dermatol. V. 30, p. 519–531, 1994.

PIEPER FR; Van de Klundert FA ; Raats JM ; Henderik JB ; Schaart G ; Ramaekers FC ; Bloemendal H. Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells. Eur J Biochem. V. 210, p. 509-519, 1992.

POON F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. Photodermatol Photoimmunol Photomed. V. 31, n.2, p. 65-74. doi: 10.1111/phpp.12145. Epub 2014 Nov 25, 2015.

PUPA SM; Ménard S; Forti S; Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset progression. J Cell Physiol, v. 192 (3), p. 259-267. 2002.

QUAN T; Wang F; Shao y; Rittié L; Xia W; Orringer JS; Voorhees JJ; Fische GJ. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes in aged human skin in vivo. Journal of Investigative Dermatology. v. 133, p. 658-667, 2013.

RAHBAR S; Natarajan R; Yerneni K; Scott S; Gonzales N; Nadler JL. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. Clin. Chim. Acta. v. 301, p. 65–77, 2000.

RAHBAR S; Figarola JL. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. Arch. Biochem. Biophys. v.419, p. 63–79, 2003.

RAJ DSC ; Choudhury D ; Welbourne TC ; Levi M. Advanced Glycation End Products: A Nephrologist's Perspective. Am J Kidney Dis, Louisiana, v. 35, n. 3, p. 365-380, Mar 2000.

RAVICHANDRAN R; Venugopala JR; Sundarrajana S; Mukherjee S; Sridhara R; Ramakrishna S. Composite poly-L-lactic acid/poly-( $\alpha,\beta$ )-DL-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration. Mat. Sci. Eng. v. 32, n. 6, p. 1443-1451, 2012.

RÉGNIER MD; Reichert CU; Schaefer H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. J. Pharm. Sci. v. 82, p. 404-407, 1993.

REIBER GE; Boyko EJ; Smith DG. Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. In Diabetes in America. M.I. Harris and M.P. Stern, editors. U.S. Government Printing Office. Bethesda, Maryland, USA. 409–428. 1995.

REIBER GE; Vileikyte L ; Boyko EJ ; del Aguila E ; Smith EG ; Lavery LA ; Boulton AJ. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. Diabetes Care. 22:157–162. 1999.

RICHARD MH; Viac J; Reano A; Gaucherand M; Thivolet J. Vimentin expression in normal human keratinocytes grown in serum-free defined MCDB 153 medium. Arch Dermatol, v. 210, p.512-515, 1990.

ROWE DW; Starman BJ; Fujimoto WY; Williams RH. Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus. Diabetes, vol. 26, no. 4, pp. 284-290, 1977.

SCHLEICHER ED; Bierhaus A; Haring HU; Nawroth PP; Lehmann R. Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. Contrib. Nephrol. v.131, p.1-9, 2001.

SECRETARIA DO ESTADO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO.

<<http://www.cienciaempauta.am.gov.br/2012/10/fototerapia-evita-amputacao-de-pe-diabetico/>> acesso em 13 de março de 2015.

SELL DR; Nelson JF; Monnier V M. Effect of Chronic Aminoguanidine treatment on age-related Glycation, Glyoxidation, and collagen cross-linking in the Fischer 344 Rat. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. v. 405-406. 2001.

SIBBALD RG; Schachter RK. The skin and diabetes mellitus, Int. J. Dermatol. 23, 567–584, 1984.

SIMPSON CL; Patel DM; Green KJ. Deconstructin the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. Nature Reviews/Molecular Cell Biology. v. 12, p. 565-580, 2011.

SMALLEY KS; Lioni M; Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. v. 42, p. 242-247, 2006.

STARK HJ ; Szabowski A ; Fusenig AE ; Maas-Szabowski N. Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated in vitro system. Biol. Proced. Online. v. 6, p. 55-60, 2004.

STERNILICHT MD; Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUJI G; Sivakam S. Glucose, glycation and aging. Biogerontology, v. 5, p. 365–373, 2004.

TANAKA R. Fukushima SI; Sasaki K; Tanaka Y; Murota H; Matsumoto T; Araki T; Yasui T. In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy. J. Biomed. Opt. V.18, n.6, June, 2013.

TENNANT JR. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. Transplantation. v. 2, s. 6, 1964.

THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE.

<<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMicm1104059>> acesso em 13 de março de 2015.

THORNALLEY PJA; Yurek-George OK. Argirov, Biochem. Pharmacol., v. 60, p. 655–665, 2000.

THORNALLEY PJ. Advanced glycation and the development of diabetic complications: unynging the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress. Endocrinol. Metab. v. 3, p. 149-166, 1996.

TIAGO M; Oliveira EM; Brohem CA; Pennacchi PC; Paes RD; Haga RB; Campa A; Barros SB; Smalley KS; Silvy ME. Tissue Eng Part A. 2014 Sep; 20 (17-18): 2412-2421. doi: 10.1089/ten.Tissue Eng A. 2013. 0473. Epub 2014 Mar 25.

TOMASEK JJ; Gabbiani G; Hinz B; Chaponnier C; Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. Nat Rev Mol Cell Biol. V. 3, p. 349–363, 2002.

VERZIJL N; DeGroot J; Thorpe SR; Bank RA; Shaw JN; Lyons TJ; Bijlsma JW; Lafeber FP; Baynes JW; TeKoppele JM. Effect of collagen turnover on accumulation of advanced glycation end products. J. Biol. Chem. v. 274, p.39027-39031, 2000.

WAAIJMAN T; Breetveld M; Ulrich M; Middelkoop E; Scheper RJ; Gibbs S. Use of a Collagen-Elastin Matrix as Transport Carrier System to Transfer Proliferating Epidermal Cells to Human Dermis In Vitro. Cell Transplantation, v. 19, p. 1339-1348, 2010.

WONG T; McGrath JA; Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. Br. J. Dermatol. v. 156, p. 1149-1155, 2007.

YANG J; Balakrishnan A; Hamamoto S; Beattie CW; Gupta TK; Wellings SR; Nandi S. Different mitogenic and phenotypic responses of human breast epithelial cells grown in two versus three dimensions. Exp. Cell. Res. v. 167, p. 563-569, 1987.

YASHIKI S; Umegaki R; Kino-Oka M; Taya M. Evaluation of attachment and growth of Anchorage-dependent cells on surfaces with type 1 collagen coating. J Biosciences and Bioengineering. V. 92, n. 4, p. 385-388. 2001.

YILDRIMER L; Thanh NTK; Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. Trends Biotechnol. v. 30, n. 12, p. 638-648, 2012.

YONEKURA H. Novel Splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and putative roles in diabetes-induced vascular injury. Biochem. J., Kanazawa, v. 370, p. 1097-1109, Mar. 2003.

ZANONI T; Tiago M; Faião-Flores F; Barros SBM; Bastc A; Hagemanc G; Oliveira DP; Maria-Engler SS. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). Toxicology Letters. V. 227, p. 139-149. 2014.

Zoumi A, Yeh A, Tromberg BJ. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. Proc Natl Acad Sci U S A. V. 99, n. 17, p. 11014-11019, 2002.



**ANEXOS**

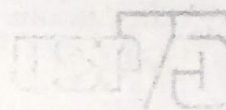
**Anexo I – Artigo publicado pela aluna, referente aos resultados obtidos durante o doutorado**

## Anexo II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/169/2009

Protocolo CEP/FCF/534

CAAE: 0062.0.198.000-09

#### I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos
Pesquisador Responsável:	Silvy Stuchi Maria Engler
Instituição:	FCF-USP
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	Não se aplica

#### II - Sumário Geral do Protocolo:

O projeto visa identificar novos alvos intracelulares para intervenção terapêutica e representa uma proposta inovadora em estudos de melanoma. As estratégias terapêuticas atuais falham quando usadas como único agente. Desta forma, o objetivo geral do projeto é caracterizar o mecanismo de ação de dois compostos (considerados como potenciais inibidores de metaloproteinases) em monocamadas e em culturas de pele artificial. O laboratório conta com modelos que reorganizam o microambiente tumoral *in vitro*, uma ferramenta valiosa, onde a pele ou estratos teciduais são reconstruídos e simula-se a invasão tumoral na derme, cultivando esta estrutura com células de melanoma.

**Os objetivos do presente estudo são:** Desenvolver uma plataforma de prospecção de novos compostos inibidores de MMPs utilizando o modelo de pele artificial *in vitro* e comparar o efeito deste microambiente com dados gerados em cultura em monocamadas. Espera-se contribuir para o conhecimento das bases moleculares da quimiorresistência de melanoma e identificar novos alvos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contribuindo para a inibição da invasão tumoral.

**Tipo de estudo:** Prospectivo

#### Descrição da Casuística:

Numero de participantes: 50

Procedência: Hospital Universitário – USP

Amostra biológica: pele de prepúcio. Não haverá coleta de sangue.

#### Os critérios de inclusão dos participantes são:

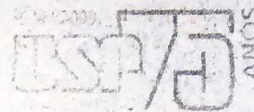
Para o grupo de estudo: pacientes (crianças e/ou menores de 15 anos) submetidos à cirurgia de reparo com fins profiláticos, isto é, de prevenção à infecção. Será utilizada a pele de prepúcio, doada perante consentimento do doador ou responsável.

Para o grupo controle: Não há grupo controle especificado.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP



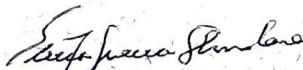
**III – Situação do Projeto: APROVADO** em reunião de 14/12/2009.

No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a pesquisadora deverá dirigir-se, somente, ao responsável legal

Cabe, ainda, ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
  - a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
  - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
  - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 14 de dezembro de 2009.

  
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP/FCF/USP



São Paulo, 15 de maio de 2015.

Ilmo(a), Sr(a),

**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 responsável:** Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler

**Equipe de Pesquisa:** Camila Eduardo Marinho, Caria Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos, Paula Comune Pennacchi, Paula Anastácia Ferreira, Fernanda Branco Filippin, Guilherme Galvão dos Santos, Renato Ramos Massaro, Bianca Ferruccio, Silvana Sandri, Tatiana do Nascimento Pedrosa, Carolina Motter Catarino, Andréa Costa Fruet, Fernanda Faião Flores.

**CAAE:** 0062.0.198.000-09

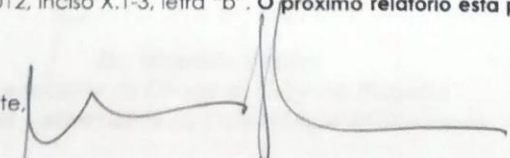
**Registro CEP-HU/USP:** 943/09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 15 de maio de 2015, analisou e APROVOU o Relatório Parcial datado de 08 de maio de 2015, referente ao período entre junho de 2013 a maio de 2015.

Reiteramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê relatórios semestrais, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde, nº 466, de 12 de dezembro de 2012, inciso X.1-3, letra "b". **O próximo relatório esta previsto para 08 de novembro de 2015.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Maurício Seckler**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital Universitário da USP

**Anexo III – Projeto de Pesquisa desenvolvido durante o doutorado sanduíche no Instituto de Pesquisa e Inovação da L'Oréal, em Aulnay Sous-Bois, França**

**Effects of specific AGE products (CML and MG-H1) in papillary fibroblasts isolated from young versus elderly donors**

PENNACCHI, Paula.

**SUMMARY**

Aged skin is characterized by flattening of the dermal-epidermal junction, atrophy and loss of elasticity of the dermal connective tissue, as well as reduction and disorganization of extracellular matrix components, such as collagen and other elastic fibers. Fibroblasts exert important functions in the regulation of tissue structure and cellular microenvironment. The observed age-related changes in fibroblasts include altered cell morphology, altered metabolism, reduced proliferative potential, loss of responsiveness to growth factors, decline in the production of extracellular matrix proteins such as type I and III collagens, and overexpression of proteases involved in the degradation of the extracellular matrix. Advanced Glycation End Products result from a non-enzymatic process that is correlated with advanced aging and/or diabetic disease in humans. Many recent studies have explored the effects of glycation induced by sugars in human skin cells and 3D models of dermis and full skin. In this study, we proposed to study the effects of isolated synthetic AGE products in monolayer cultured dermal fibroblasts and in 3D skin models.

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 Advanced Glycation End Products (AGEs)

Chronological aging is described as a time-dependent biological process leading to gradual changes in the structure and functions of all tissues that compose an organism. Aging of the skin is the result of both extrinsic factors - mostly sun exposure - and intrinsic factors representing chronological aging (ASSILINEAU et al., 2003). These modifications tend to decrease the capacity of adaptive responsiveness and wound healing of skin, and therefore enhance its susceptibility to disorders and epithelial cell death (MINE et al., 2008). Aged skin is characterized by flattening of the dermal-epidermal junction, marked atrophy and loss of elasticity of the dermal connective tissue (MONTAGNA et al., 1979), associated with a reduction and disorganization of its major ECM components, such as collagen and other elastic fibers (LAVKER et al., 1987), proteoglycan and glycosaminoglycan (CARRINO et al., 2003).

Dermis is a central layer in human skin, situated between the outer layer epidermis, a keratinized stratified epithelium, and hypodermis, the inner layer. There is close communication between the dermis and epidermis, which are physically separated and physiologically connected by the basement membrane zone (PAGEON et al., 2012). The dermis is a tissue rich in matrix elements and poor in cellular content, and it is generally accepted that modifications occurring in the matrix are the ones that mostly contribute to skin aging by altering its biomechanical properties (ASSELINEAU et al., 2088).

Human fibroblasts can be isolated from various connective tissues, including skin (RITTIÉ & FISHER, 2005). These cells exert important functions in the regulation of tissue structure and cellular microenvironment through the production of ECM proteins

(POSTLETHWAITE & KANG, 1999), cytokines, growth factors (SMITH et al., 1997), and matrix metalloproteinases (KAHARI & SAARIALHO-KERE, 1997).

Alterations of fibroblast properties, associated with aging or senescence, have been studied either in long-term normal cell cultures (HAYFLIC, 1979; GOLDSTEIN, 1990; CRISTOFALO & PIGNOLO, 1993), or in cultures of fibroblasts from skin biopsies derived from donors with increasing age (SCHNEIDER, 1979). The observed age-related effects in fibroblasts include altered cell morphology, altered metabolism (HAYFLIC, 1979), reduced proliferative potential (HAYFLIC, 1979; SCHNEIDER, 1979; SMITH et al., 1978), loss of responsiveness to growth factors (REENTRA et al., 1993), decline in the production of ECM proteins such as type I and III collagens (VARANI et al., 2006), and overexpression of proteases involved in the degradation of the ECM (WEST et al., 1989). Reduction of telomere length (CAMPISI et al., 2001), accumulation of free radical-induced DNA damages, and decrease of DNA repair (YAAR & ELLER, 2002) are molecular mechanisms associated with senescence induction (MINE et al., 2008). Therefore, glycation adducts may be important risk markers of disease development (THORNALLEY et al., 2003).

The non-enzymatic glycation of proteins, i.e. AGEs, is a common factor in the pathophysiology of a number of aging-related disorders and diseases such as diabetes mellitus. In elderly subjects, the non-enzymatic glycation is high, not only because of possible hyperglycemia, but also due to long-term exposure to normoglycemic conditions. The glycation of proteins has been described in skin (HOFMANN et al., 2013) and in other organs such as the kidney, blood vessels, and lens (CRISAN et al., 2013). The glycation process is involved not only in intrinsic aging processes (individual, genetic attributes), but also in extrinsic stimuli (UV light, pollution and lifestyle), and can be

quantified in epidermal and dermal compartments by histological, immunohistochemical, imaging or fluorimetric assays (PAGEON et al., 2008; CRISAN et al., 2012).

In skin aging, glycation affects endothelial cells, fibroblasts and proteins (collagen, elastin, glycoproteins and glycosaminoglycan; CRISAN et al., 2013). The glycation of ECM on dermis can affect fibroblasts growth, differentiation and motility, cytokine responses, enzymatic activity (metalloproteinases) and vascular hemostasis (PAGEON et al., 2008).

Many recent studies have explored the effects of glycation induced by sugars in human skin cells, and in 3D models of dermis and full skin (Pageon et al., 2005; 2007; 2008; 2010; 2014). In this study, we proposed to investigate the effects of isolated AGEs in monolayer cultured dermal cells, i.e. fibroblasts, and in 3D reconstructed skin models (Pageon et al., 2015).

## 1.2 **CML** (N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine)

AGEs, such as N $\epsilon$ -(Carboxymethyl)-lysine (CML), are considered biomarkers of aging, and have been shown to be increased nearly five times from childhood to old age (DYER et al., 1993). CML is one of the most studied AGEs (AHMED et al., 1986) and has been detected in several types of human fluids and tissues (MATSUMOTO et al., 2009; BAIDOSHVILI et al., 2006; KAJI et al., 2000; FRANKE et al., 2003; CASTELLANI et al., 2002; TANJI et al., 2000; YOSHIDA et al., 1998).

CML is formed on proteins due to a combination of non-enzymatic glycation and oxidation (glycoxidation) reactions (FU et al., 1996). Glyoxal is one of the intermediate products in the formation of CML from oxidation of glucose or peroxidation of polyunsaturated fatty acids (Fu et al., 1996; WELLS-KNECHT et al., 1995). Ultraviolet (UV) radiation is thought to be involved in CML formation in the epidermis (KAWABATA



et al., 2011), because UV is known to generate reactive oxygen species (ROS), which may induce the glyoxal formation in keratinocytes (KOVACS et al., 2009).

In the skin, AGE accumulation has been described in dermal compartment, affecting proteins such as fibronectin, elastin and collagen (OYER et al., 1993; JEANMARIE et al., 2001; MIZUTARI et al., 1997). Moreover, CML accumulation in dermal collagen occurs faster in diabetic patients and old-aged people, leading to tissue stiffening (DYER et al., 1993).

### 1.3 **MG-H1** (N<sub>ε</sub>-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine)

Another aging biomarker AGE is the N<sub>ε</sub>-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1), which is found in high concentrations in many tissues and body fluids of age-advanced people (THORNALLEY et al., 2003). The MG-H1 is a methylglyoxal-derived hydroimidazolone; methylglyoxal is a potent glycating agent that reacts with human serum albumin under physiological conditions to form mainly the hydroimidazolone MG-H1 [N<sub>ε</sub>-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine] (92% of total modification; AHMED et al., 2005).

THORNALLEY et al. (2003) measured the concentrations of the early glycation adduct fructosyl-lysine and 12 types of AGEs in physiological fluids and in enzymatic hydrolysates of cellular and extracellular proteins. This study showed that hydroimidazolones, such as MG-H1, were the most abundant glycation biomarkers; monolysyl adducts (CML and CEL) were found in moderate amounts, and bis(lysyl), imidazolium cross-links and pentosidine were found in lowest amounts in the analyzed physiological fluids, i.e. plasma and urine samples (THORNALLEY et al., 2003).

## 2 MATERIAL & METHODS

### 2.1 Skin samples and fibroblast cultures

Normal human skin was obtained from breast reduction surgery from patients of different ages. Cells were isolated as previously described (BERNERD & ASSELINEAU, 1997; BERNERD & ASSELINEAU, 1998; PAGEON et al., 2007). After removing the subcutaneous tissue, skin samples were sectioned using a dermatome. The upper part of skin samples (0.3mm depth section, from the outer to inner surface) contains the epidermis and the papillary dermis. The epidermis was separated from the papillary dermis by dissection after treatment with 0.25% trypsin for 1.5 hours at 37°C.

For the preparation of papillary fibroblasts, sections of superficial dermis were placed in culture in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> (MINE et al., 2008).

Human skin samples from donors of various ages (20-70 years old) were used for comparison of the synthetic AGEs peptides. **Table 1** shows the laboratory codes and ages of donors.

**Table 1.** Laboratory codes of skin samples and age of donors.

Young donors		Elderly donors	
Code	Age	Code	Age
FP195	22 years old	FP188	66 years old
FP207	25 years old	FP189	67 years old
FP212	21 years old	FP206	61 years old
FP224	18 years old	FP210	65 years old

### 2.2 Cell Culture Maintenance

Fibroblasts were maintained in MEM supplemented with 10% bovine fetal serum and antibiotics (100 U/ml ampicillin and 100 g/ml streptomycin) in a humidified atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured when they reached approximately 80% of saturation density, using trypsin 0.05%/EDTA.

### 2.3 Toxicity kinetics curve

Fibroblasts from patients of 18 to 67 years old were plated in 6-well cell plates and treated with AGEs at different concentrations.

To test the cytotoxicity of CML and MG-H1, we started the treatments with lower concentrations: 0 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 200 $\mu$ M of CML, during 24 hours, 48 hours, 4 days, 6 days or 8 days. As no cytotoxic effect was observed by the Trypan blue assay, we altered the treatments to: 0 $\mu$ M, 200 $\mu$ M or 400 $\mu$ M of CML or MG-H1 during 24 hours, 4 or 7 days. No decreases in cell viability were observed, therefore, we used the higher concentration (600 $\mu$ M) of CML or MG-H1 and the higher time of exposure (1 week) for the subsequent experiments. After the AGEs exposure period, the culture supernatant was collected, and kept at -80°C until the ELISA assays.

### 2.4 $\beta$ -Galactosidase-positive cells detection

Ravelojaona et al. (2009) showed that the glycation products (AGE-BSA) play an important role in fibroblasts senescence induction after successive passages in culture. In this context, we performed an assay to determine if the synthetic AGEs (CML and MG-H1) have the same capacity to induce cell senescence. The detection of SA- $\beta$ -Gal-positive cells was performed using a commercial kit (Senescence Detection Kit, Promokine PK-CA 577 – K320) according to instructions provided by the manufacturer.

First, fibroblasts from four different donors - two young (18 and 22 years old), and two elderly donors (66 and 67 years old) - were plated in 60 mm cell culture dishes, and exposed to CML or MG-H1 at 600  $\mu$ M in MEM 1% FCS during successive passages for 15 weeks. Approximately once a week, when plates reached 80% of confluency, cells were subcultured by Trypsin digestion; a fraction of these cells were transferred to 12-well cell plates (4500 cells/cm<sup>2</sup>) in MEM 10% FCS without AGE products, and the

remaining cells were maintained in culture. At each passage, the 12-well cell plates were fixed and incubated with a solution of  $\beta$ -gal substrate (X-gal, 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-b-galactoside). After 24 h of incubation, blue-stained cells expressing SA- $\beta$ -Gal were counted under an optical microscopy.

## 2.5 Enzyme – Linked Immunoassays (ELISA)

To measure the release of inflammatory cytokines IL-6 and MCP-1 (CCL2), the fibroblasts culture medium was collected after 7 days of exposure to AGEs (CML or MG-H1 600  $\mu$ M). For this purpose, ELISA commercial kits for IL-6 (Quantikine<sup>®</sup> ELISA, Human IL-6 Immunoassay, R&D Systems, Inc. USA) and MCP-1 (Quantikine<sup>®</sup> ELISA Human MCP-1/CCL2 Immunoassay, R&D Systems, Inc. USA) were used according to the manufacturer's instructions.

## 2.6 Immunoassay in culture slides (cells adhered to glass)

To evaluate aspects of morphology, proliferative rate and binding of AGE products, 3000 fibroblasts/well were seeded in a glass culture slide (Falcon<sup>®</sup> 4-wells culture slide), and incubated with CML (600  $\mu$ M) or MG-H1 (600  $\mu$ M) during 7 days in MEM 1% FCS. Cells were washed with PBS and fixed with Paraformaldehyde 4% at room temperature during 15 minutes. After 3 consecutive washings with PBS, nonspecific sites were blocked by incubation with Tween 20 0.2% and BSA 1% in PBS for 1 hour at room temperature, followed by incubation with primary antibodies anti-Tropoelastin diluted at 1:80 (Polyclonal rabbit anti-human tropoelastin, Abcam, ref. ab21600), anti-Fibrillin diluted at 1:100 (Mouse Anti-Fibrillin, SouthernBiotech, clone 11C1.3, ref. 1405-1) and anti-Fibronectin diluted at 1:100 (Mouse monoclonal antibody, Millipore MAB1892) in PBS with BSA 0.05% overnight at 4°C. Cells were further washed

3 times with Tween 20 0.2% in PBS, and incubated with secondary anti-mouse IgG antibody (Invitrogen® Goat anti-mouse IgG Alexa488, ref. A11029) diluted at 1:500 or Anti-rabbit IgG (Invitrogen Chicken anti-rabbit Alexa488, ref. A21441) diluted at 1:200 in Tween 20 0.2% in PBS during 90 minutes at room temperature, followed by 3 consecutive washings in Tween 20 0.2% in PBS and mounting of cover slides with medium containing Dapi.

## 2.7 Collagen treatments

Glycation of the collagen matrices was performed as described previously by Pigeon et al. (2007) with minor modifications. Briefly, bovine type I collagen (Symatase® ref. ACI200) at 5 mg/mL in acetic acid solution (0.017 N) was incubated in the presence of sugars (Glucose 200mM and Ribose 10mM) at room temperature during one week in the dark. After that, samples were dialyzed during 4 days in acetic acid 0.5 N and further 3 days in acetic acid 0.017 N at 4°C, with daily changes of dialysis solution. One collagen sample containing water instead of sugars was used as a control.

The glycation of collagen was monitored as follows: an aliquot of treated collagen was submitted to pepsin digestion (Sigma® 100 µg pepsin in 0.5 mL acetic acid 0.5 M) at 37°C during 4-6 hours. At the end of the incubation, the fluorescence of digested collagen was measured for detection of total AGEs ( $\lambda_{\text{ex}}370 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}}440 \text{ nm}$ ) and pentosidine ( $\lambda_{\text{ex}}328 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}}378 \text{ nm}$ ; PAGEON et al., 2007).

## 2.8 Dermal Equivalents

In order to study the effects of the specific AGE products in dermis, we reconstructed the dermal equivalents as described previously (PAGEON et al., 2014). For this purpose, we performed modification of collagen by glycation or by addition of

CML or MG-H1. Lattices were prepared using human papillary fibroblasts embedded into collagen gels as previously described (PAGEON et al., 2007). The contraction of lattices was measured daily during 7 days of culture at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

We used 5 different testing conditions for the preparation of dermal equivalents (lattices), as observed in **Figure 1**.



**Figure 1.** Schematic design representing different lattices conditions.

Natif Group: control dermis using commercial bovine type I collagen;

Temoin Group: commercial bovine type I collagen plus control collagen (incubated with water instead of sugars and dialyzed as the glycated group)

Glycated Group: bovine type I collagen modified by 1 week incubation with sugars (glucose 200mM and ribose 10mM) plus commercial bovine type I collagen (ratio 1:1);

CML Group: commercial bovine type I collagen with CML 600 µM (added at the moment of preparation of lattices);

MG-H1 Group: commercial bovine type I collagen with MG-H1 600 µM (added at the moment of preparation of lattices).

## 2.9 Reconstructed Skin

To study the effects of the specific AGE products on reconstructed human skin, we performed the same culture protocol and testing conditions used for Dermal Equivalents described in section 2.8 with minor changes. After 4 days of lattices contraction, human keratinocytes (donor 207) were seeded at a density of 60000 cells per skin. The skins were maintained submersed during 7 days to allow cell proliferation and, after that,

transferred to a stainless grid to allow cell stratification in an air-liquid interface during 7 days. The glycation compounds CML and MG-H1 (600 $\mu$ M) were replaced 3 times per week.

## **2.10 Hematoxylin/Eosin (H&E) staining and immunofluorescence (tissue slides)**

After the culture period, lattices or reconstructed skins were fixed (paraformaldehyde 4%) during up to 12 hours at room temperature and embedded in histological paraffin for morphology evaluation by H&E staining.

For immunofluorescence assays, fresh samples were placed in molds, covered with freezing mounting medium (TissueTek<sup>®</sup>) and immediately frozen in liquid nitrogen. After that, samples were sliced into 5 – 8  $\mu$ m sections using a cryostat and laid on glass slides, which were kept at room temperature for 24 hours for adhesion of sections. After this period, the slides were stored at -20 °C until the time of immunofluorescence assay, which is described below.

First, the slides were immersed in an acetone bath at -20 °C during 5 minutes and dried at room temperature for 2 minutes for post-fixation. The sections were rehydrated in PBS bath during 15 minutes. The sample areas were encircled with a hydrophobic pen and incubated with PBS + BSA 1% or PBS + rabbit serum 10% during 1 hour for blocking nonspecific sites. Slides were washed during 2 minutes in PBS and incubated with primary antibody (Table 2) in PBS at 4°C overnight or during 2 hours at room temperature. After this incubation, samples were washed two times in PBS (5 minutes each) and incubated with secondary antibody coupled to fluorophore (Table 2) in PBS during 90 minutes at room temperature. Samples were washed two times in PBS (5 minutes each) and covered with mounting medium containing Dapi and glass coverslip.

Table 2. Work dilutions and specifications of primary and secondary antibodies.

Primary Antibodies		
Anti-Fibrillin	Mouse Sounthern Biotech 1405-01 clone 11C1-3 IgG	1:50
Anti-Fibronectin	Mouse monoclonal Millipore MAB1892	1:100
Anti-Tropoelastin	Rabbit polyclonal Abcam ab21600	1:50
Anti-Ki67	Mouse IgG LeicaNCL-Ki67-MM1	1:20
Anti-Laminin	Mouse monoclonal Millipore MAB 19562	1:100
Secondary Antibodies		
Anti-mouse IgG	Invitrogen Goat anti-mouse Alexa488 A11039	1:500
Anti-rabbit IgG	Invitrogen Chicken anti-rabbit Alexa488 A21441	1:200

### 2.11 Analysis of results

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error. Experiments were performed in triplicate. Analyses were performed by comparing the parameters between the control group (non-treated and non-glycated) and the different experimental conditions.

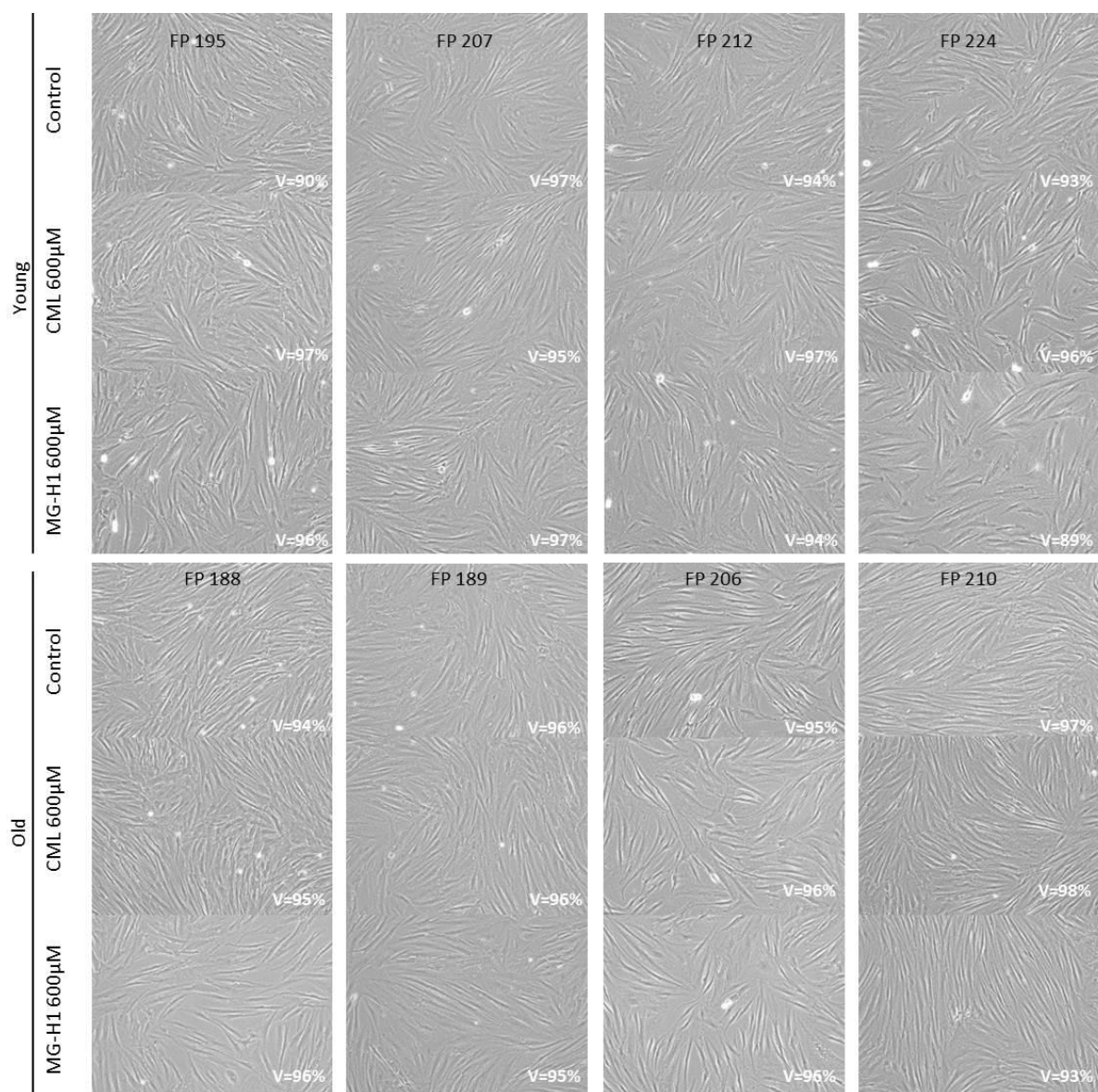
## 3 RESULTS

### 3.1 Effects of CML or MG-H1 on fibroblasts viability

In order to detect CML cytotoxicity, initially, we performed a kinetics curve assay using different-aged donor's fibroblasts exposed to 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M or 200 $\mu$ M of CML during 24 hours, 48 hours, 4 days, 6 days or 8 days (data not shown), after 200 $\mu$ M or 400 $\mu$ M of CML or MG-H1 during 1, 4 or 7 days (data not shown) in MEM 1% FCS medium. As no effects on cells viability were observed in these experimental conditions, other experiments were performed using higher concentrations of CML or MG-H1 (600 $\mu$ M) during 1 week of exposure.

After the exposure period, cells were counted to evaluate the viability by Trypan blue assay. As it is possible to see in **Figure 2**, no significant cytotoxicity effects of CML or MG-H1 were observed, as the cell viability was up to 90% for all tested conditions.

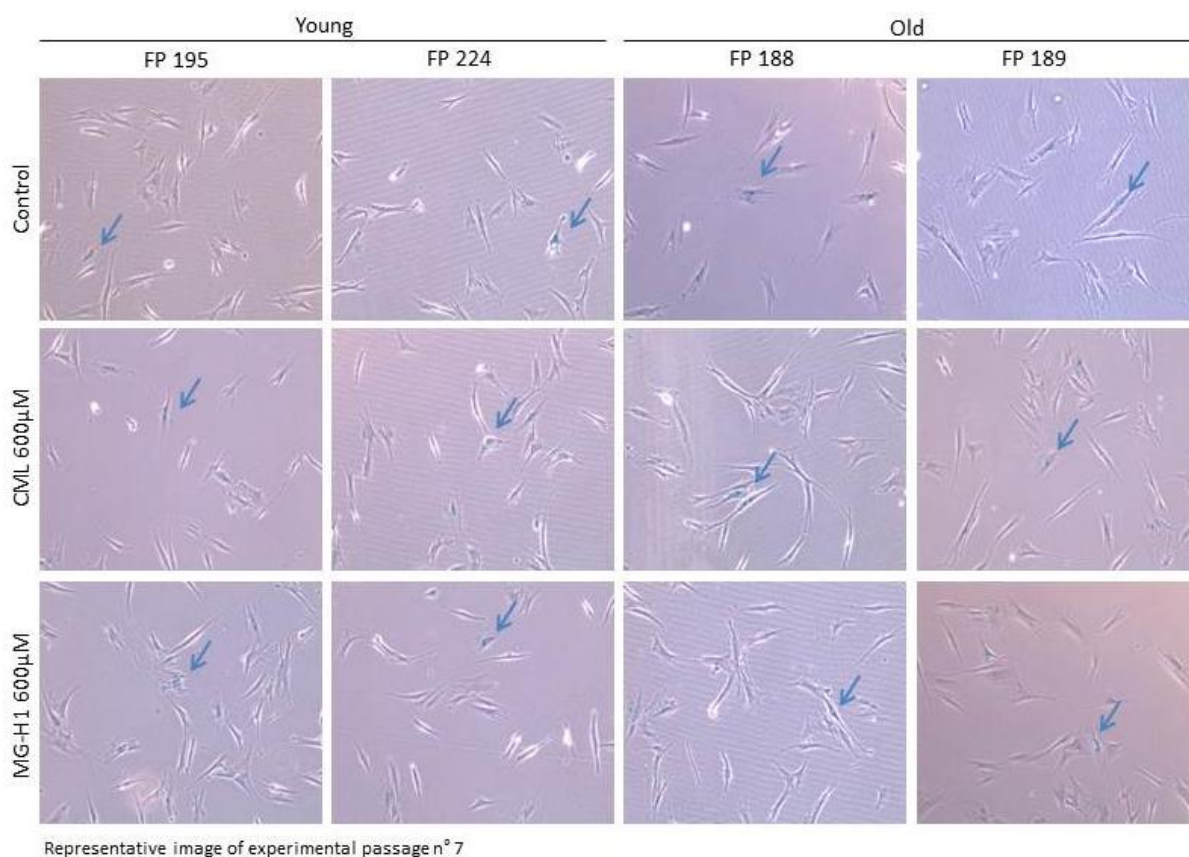




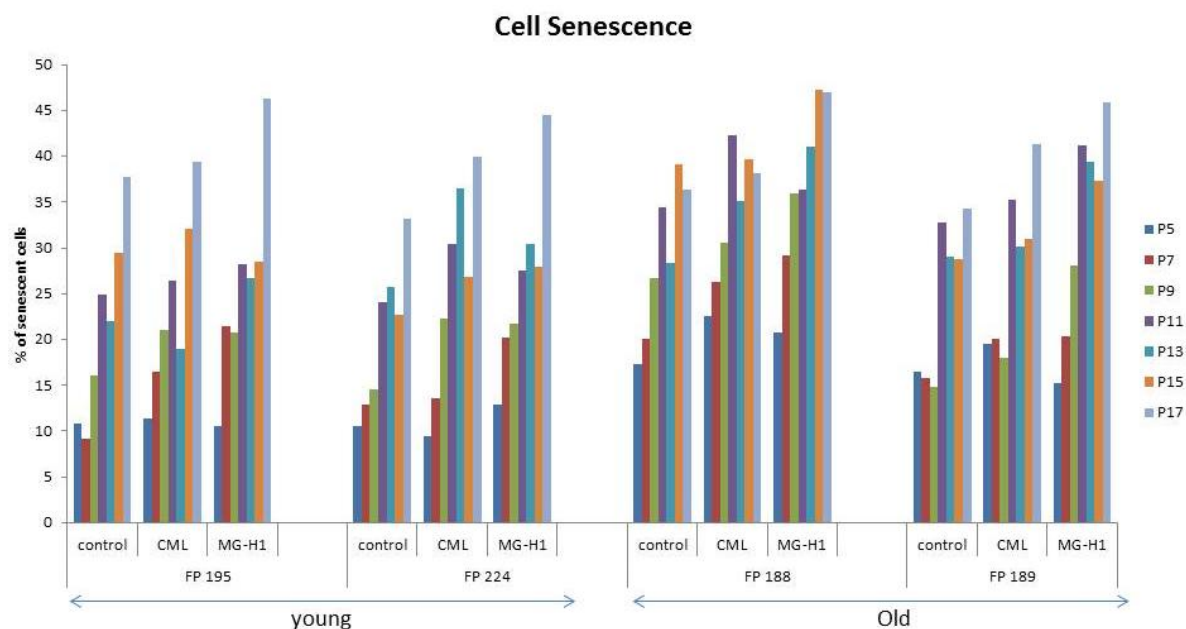
**Figure 2.** Photomicrograph of fibroblasts exposed during 1 week to CML 600µM or MG-H1 600µM. No toxic effects were observed in cell viability percentage (V) accessed by Trypan blue assay. 100x magnification.

### 3.2 Increase of senescence after CML and MG-H1 treatment

**Figure 4** shows the blue-stained SA- $\beta$ -Gal-positive cells in passage n°7 from the different testing conditions and **Figure 5** expresses these results as a percentage of increase of senescence-positive cells of each culture passage compared to the control. The exposure of fibroblasts to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M for one week caused a linear increase in SA- $\beta$ -Gal positive cells after successive passages. The number of positive cells in control groups increased according to the advanced time in culture, as expected. Nevertheless, the increase was more expressive when cells were pre-exposed to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M.

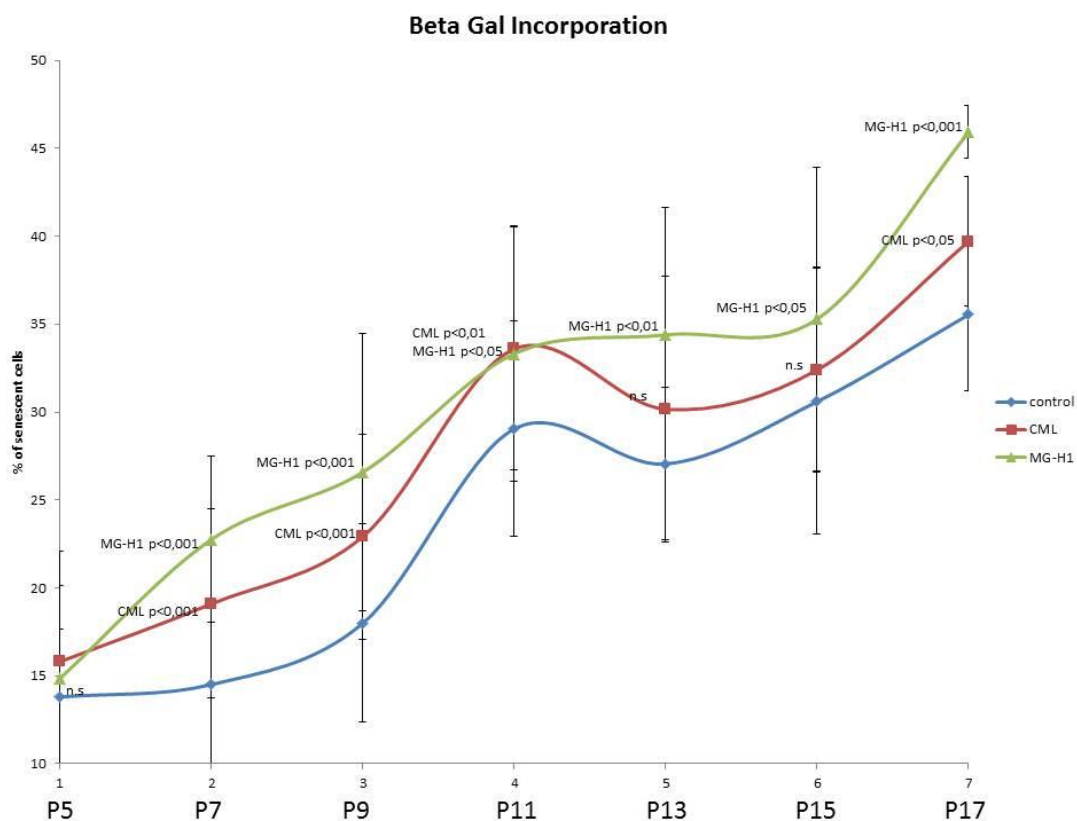


**Figure 4.** Photomicrograph of CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M pre-treated fibroblasts, after SA- $\beta$ -Gal Incorporation assay. SA- $\beta$ -Gal positive cells were stained in blue. 100x magnification.



**Figure 5.** Percentage of increase of SA-β-Gal-positive cells in fibroblasts from different age donors after exposure to CML 600μM or MG-H1 600μM.

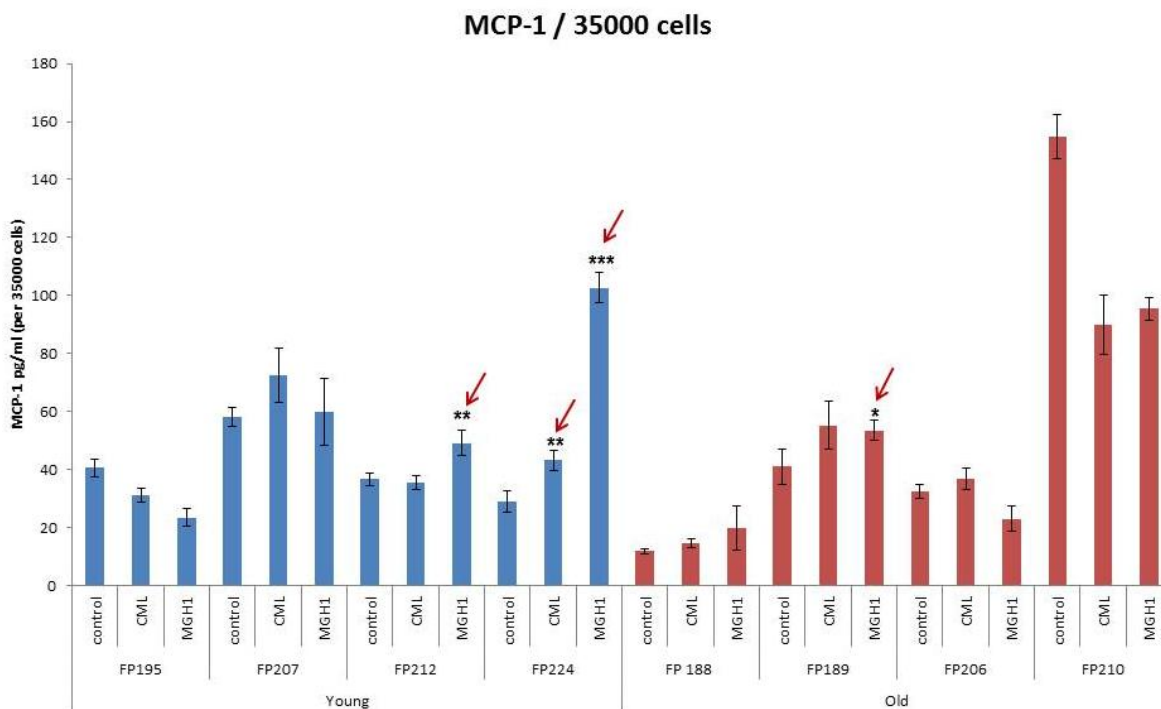
Considering that no age-related effect was observed, we plotted the data regarding the AGEs exposure in a graphic that gathers the senescence response from all cell donors (**Figure 6**).



**Figure 6.** Percentage of increase of SA- $\beta$ -Gal-positive cells from four different donors, i.e. two young (18 and 22 years old) and two elderly individuals (66 and 67 years old), after exposure to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M.

### 3.3 Effects of CML or MG-H1 on inflammatory mediators release

We tested the effects of CML or MG-H1 on fibroblasts release of interleukin 6 (IL-6), which is a chemokine that acts both as a pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine. In order to quantify the IL-6 release, we collected the cell culture supernatant after 1 week of CML or MG-H1 exposure for the ELISA analyses. Contrary to our expectations, we did not observe significant effects on IL-6 release in neither of the different experimental conditions (data not shown). Thus, we investigated a second soluble factor, the monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). **Figure 7** shows that fibroblasts from different donors responded differently to CML or MG-H1. Significant increases for MCP-1 were found after treatment with MG-H1 in fibroblasts from two young and one elderly donor, and after treatment with CML in fibroblasts from one young donor.

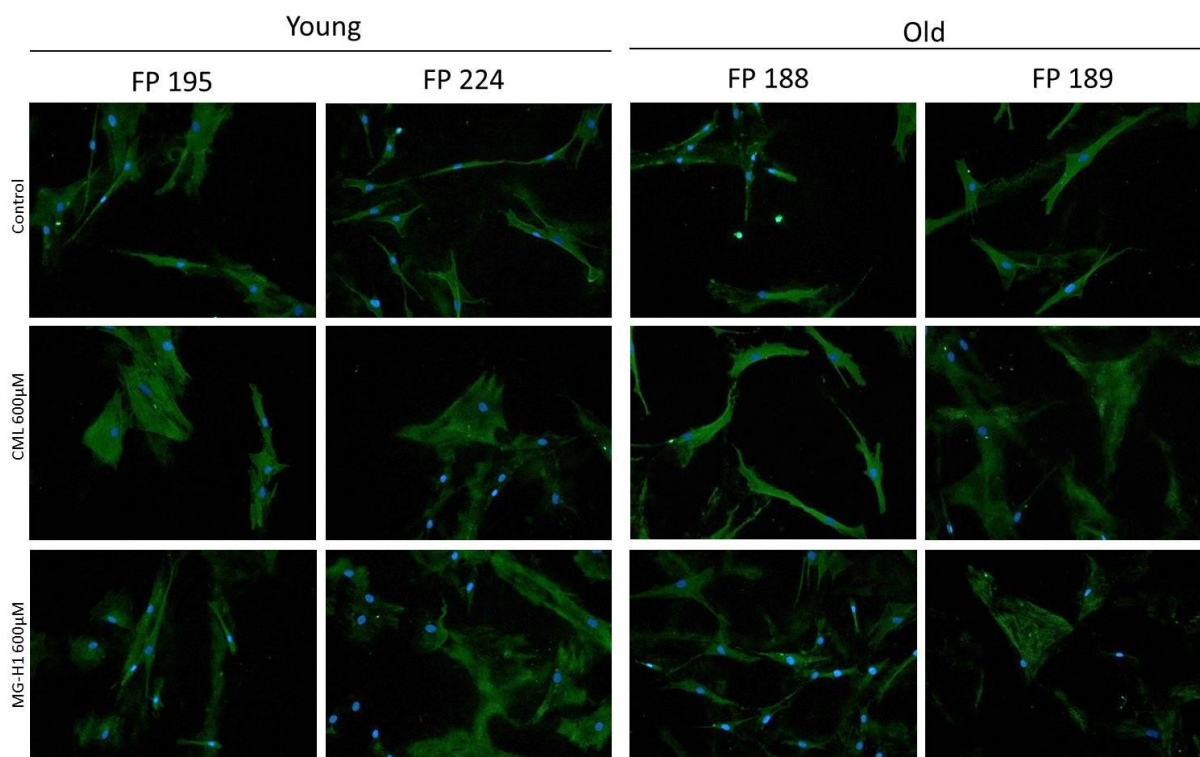


**Figure 7.** MCP-1 released by fibroblasts obtained from 8 different donors, after 1 week of exposure to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.4 Effects of CML or MG-H1 on ECM protein expression

In order to evaluate the effects of CML and MG-H1 in fibroblasts protein expression, we performed an immunoassay to detect the production of ECM proteins, which are the main targets of glycation in human dermis (KAWABATA et al., 2011; JEANMARIE et al., 2001; MIZUTARI et al., 1997).

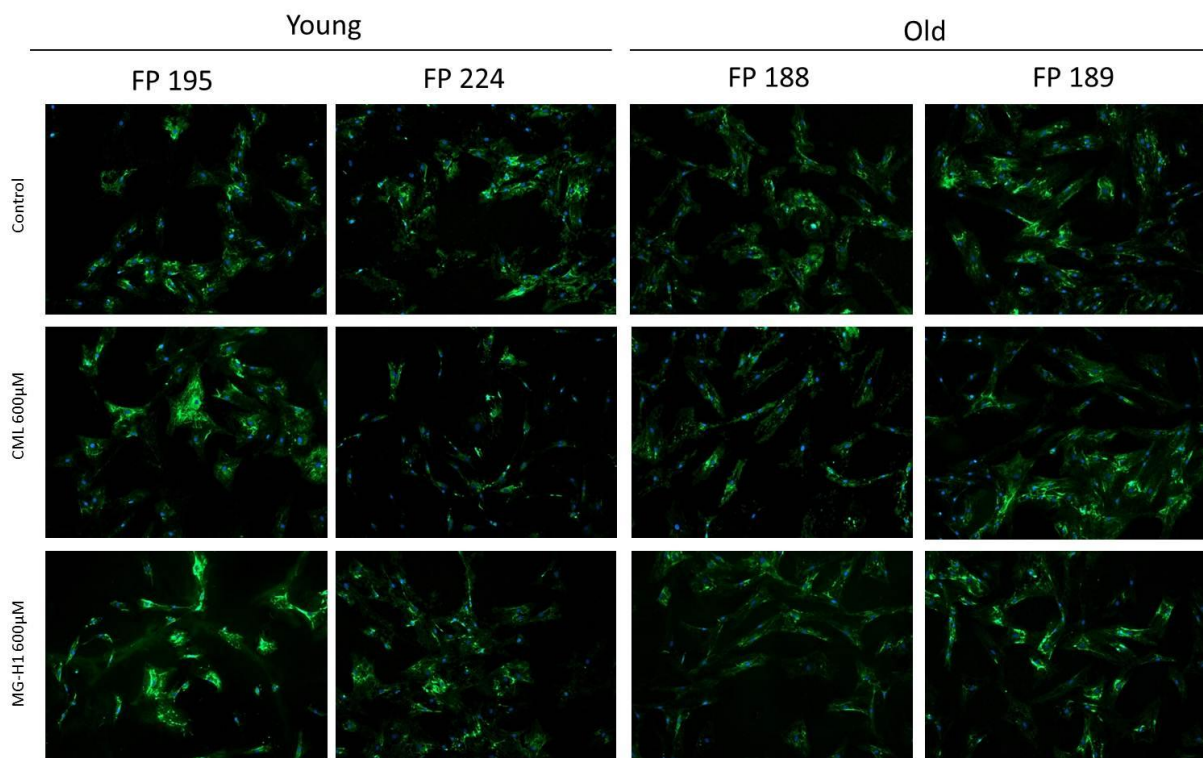
Fibrillin is an essential glycoprotein for the formation of elastic fibers found in connective tissue. This protein is secreted into the ECM by fibroblasts and is incorporated into the insoluble microfibrils, which appear to provide a scaffold for deposition of elastin. The treatment with AGE compounds did not affect the expression of Fibrillin, as depicted in **Figure 8**.



**Figure 8.** Photomicrographs of fibroblasts treated with CML 600µM or MG-H1 600µM, immunostained for the detection of Fibrillin. 100x magnification.

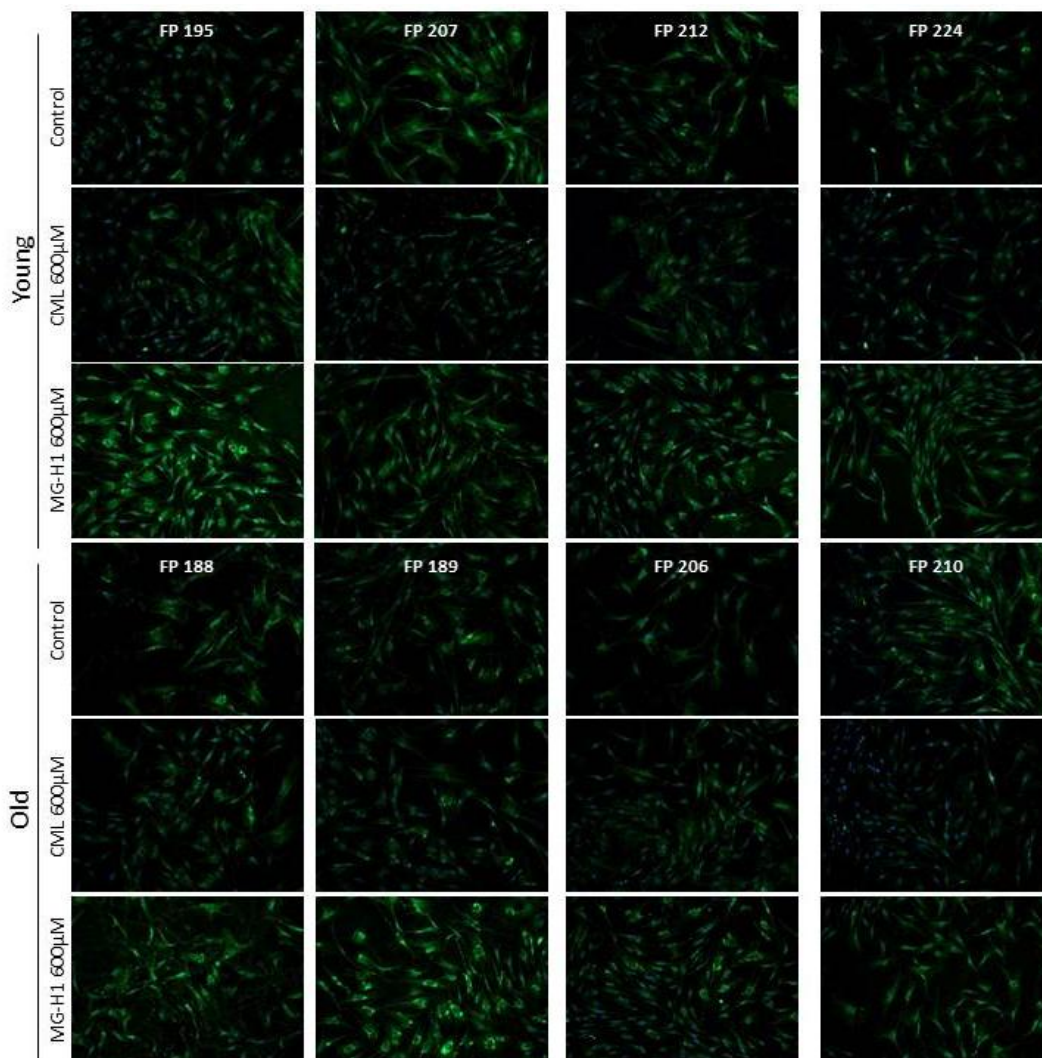
We also investigated the expression of fibronectin, which is a glycoprotein found in the ECM that binds to ECM components such as collagen and fibrin, and is a major

component of the ECM. This protein is secreted by various cells, primarily fibroblasts, as a soluble protein dimer and is further assembled into an insoluble matrix in a complex cell-mediated process. Fibronectin plays a major role in cell adhesion, growth, migration and differentiation, and it is important for processes such as wound healing. The treatment of cells with CML (600 $\mu$ M) or MG-H1 (600 $\mu$ M) did not induce changes on Fibronectin expression in young or elderly fibroblasts, as depicted in **Figure 9**.



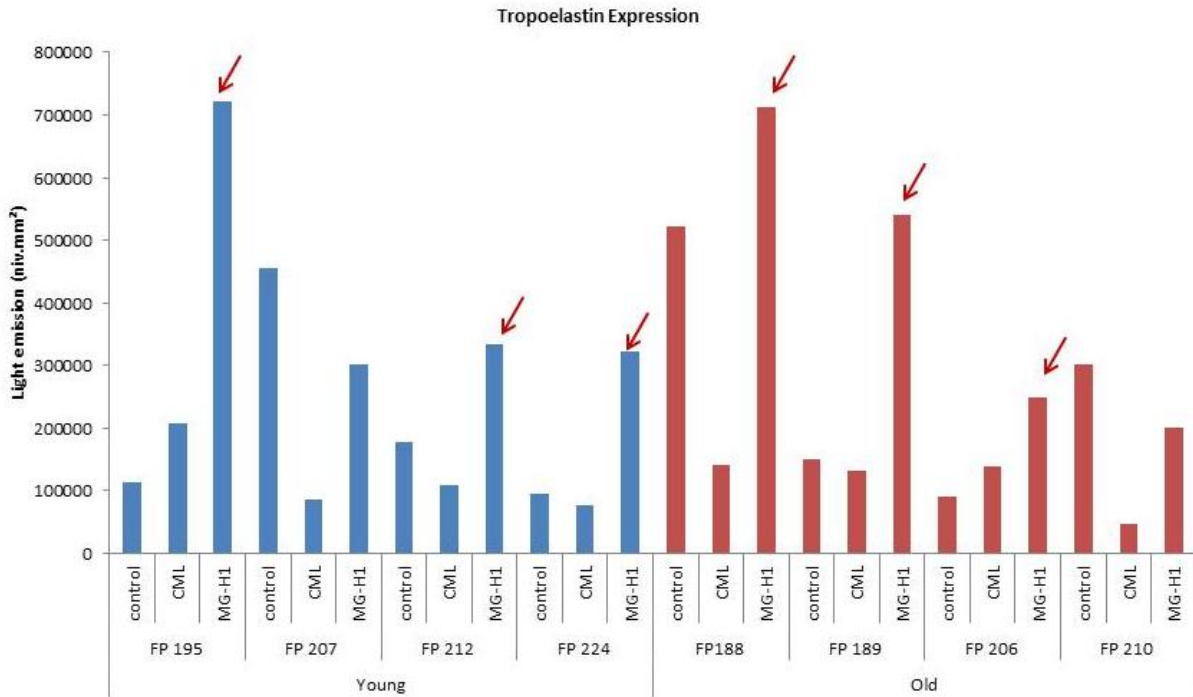
**Figure 9.** Photomicrographs of fibroblasts treated with CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M, immunostained for the detection of Fibronectin. 100x magnification.

We also performed an immunofluorescence assay to detect Tropoelastin, a water-soluble molecule that can bind covalently through crosslinks to form elastin. As opposed to the first investigated ECM proteins, the expression of Tropoelastin by papillary fibroblasts was affected by exposure of cells to the AGEs (**Figure 10**).



**Figure 10.** Photomicrographs of fibroblasts treated with CML 600µM or MG-H1 600µM, immunostained for the detection of Tropoelastin. 100x magnification.

As observed in **Figure 10**, treatment with CML (600µM) apparently decreased Tropoelastin expression in young donors, but not in elderly donors. However, cell incubation with MG-H1 (600µM) caused a remarkable increase in Tropoelastin expression in both groups of donors. The intensity of fluorescence was quantified and the results are shown in **Figure 11**.

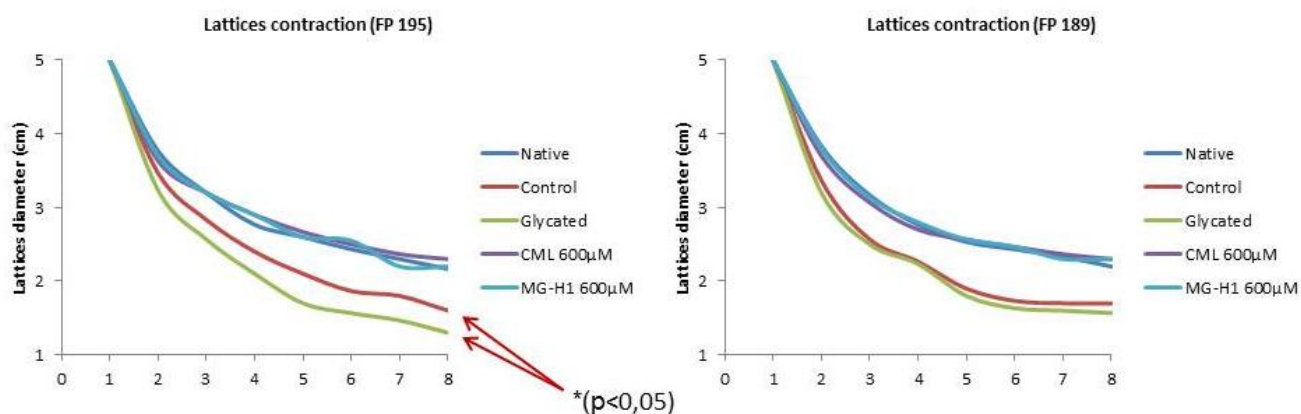


**Figure 11.** Tropoelastin quantification by fluorescence intensity measurement in fibroblasts obtained from 8 different donors, after 1 week of exposure to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M.

### 3.5 Effects of CML or MG-H1 in 3D skin model

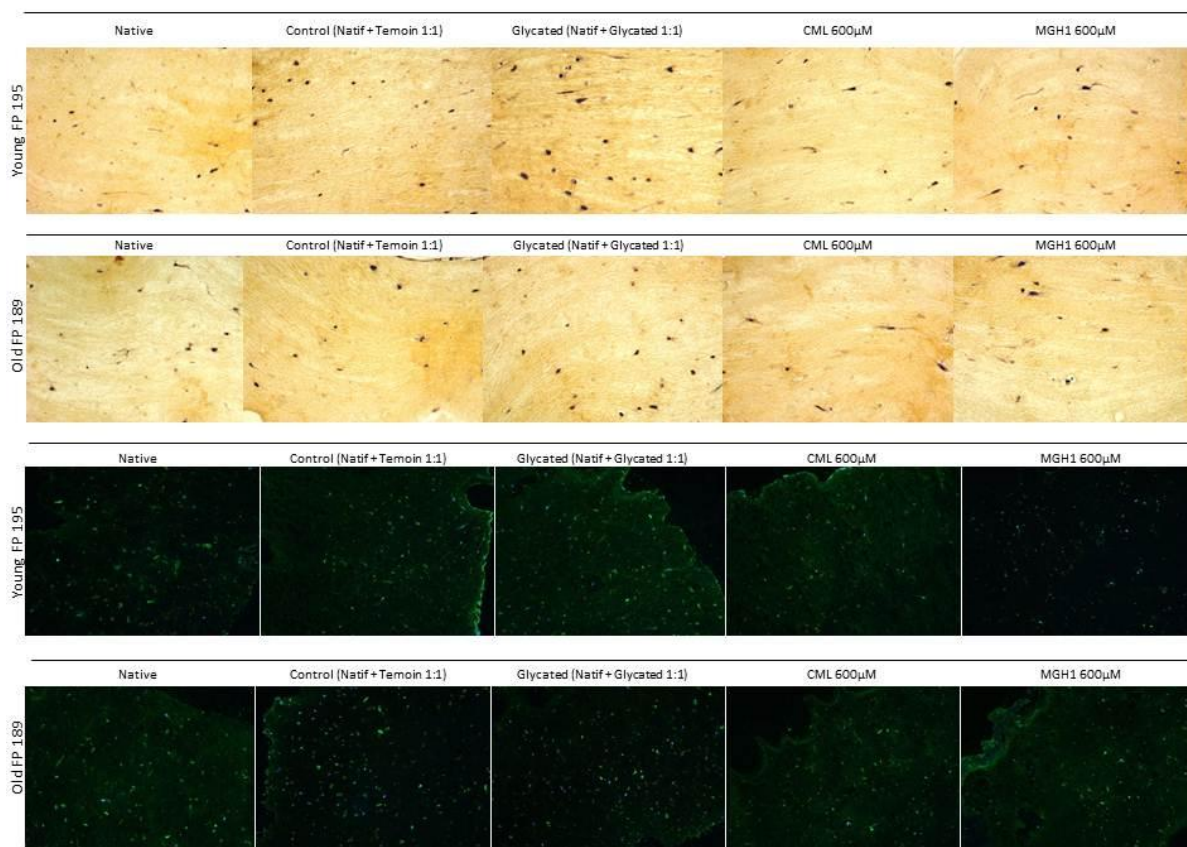
The contraction of lattices was observed for 7 days after incorporation of CML or MG-H1 to the collagen but no significant effects occurred as a result of the exposure. However, we found interesting data on contraction capacity between young and elderly donors in glycated dermis, as depicted in **Figure 12**.





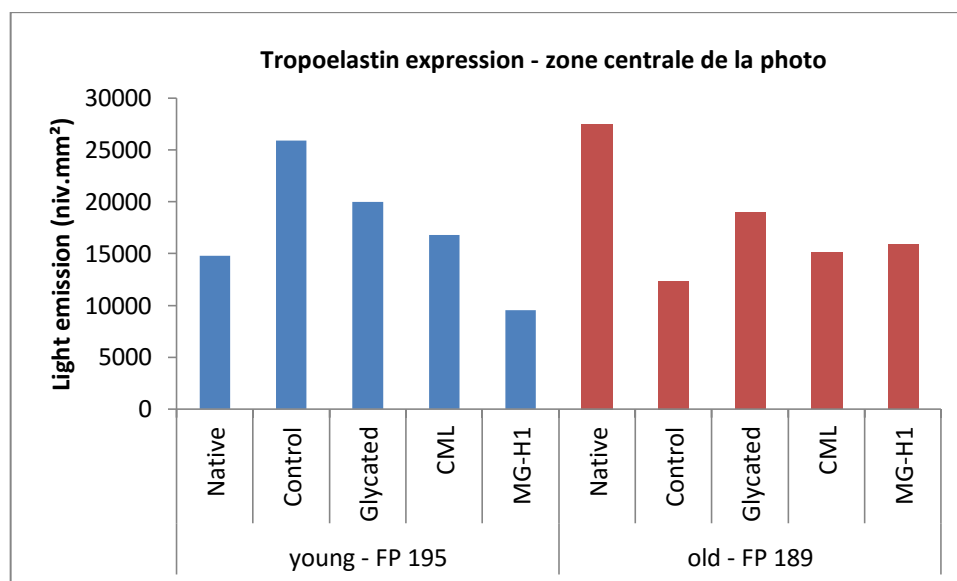
**Figure 12.** Contraction of dermal equivalents after 7 days of exposure to CML 600µM or MG-H1 600µM.

The histological and immunofluorescence analysis for Tropoelastin detection in lattices is shown in **Figure 13**.



**Figure 13.** Photomicrographs of lattices stained with Eosin & Hematoxylin or stained for immunofluorescent detection of Tropoelastin after exposure to CML 600µM or MG-H1 600µM. 100x magnification.

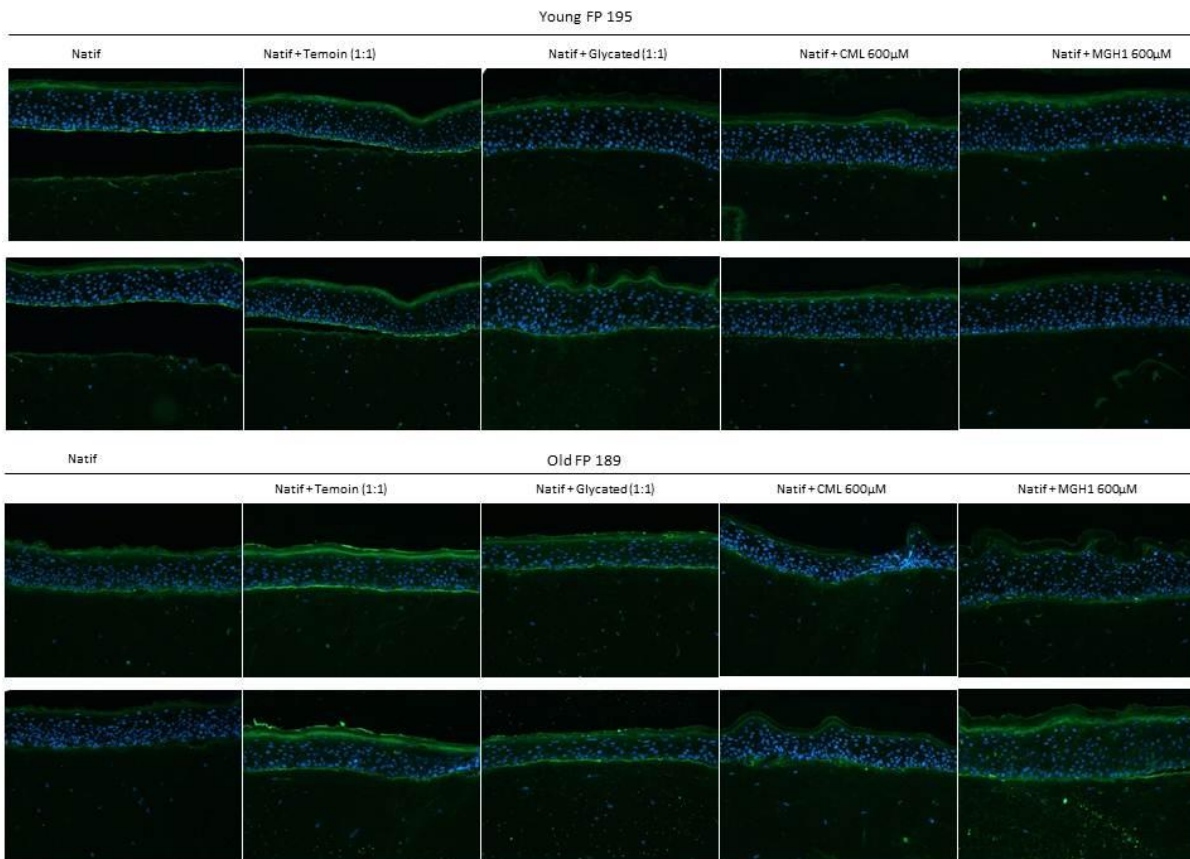
We did not observe the same results of Tropoelastin expression in the dermal equivalent model, compared to the monolayer assay, as depicted in **Figure 14**.



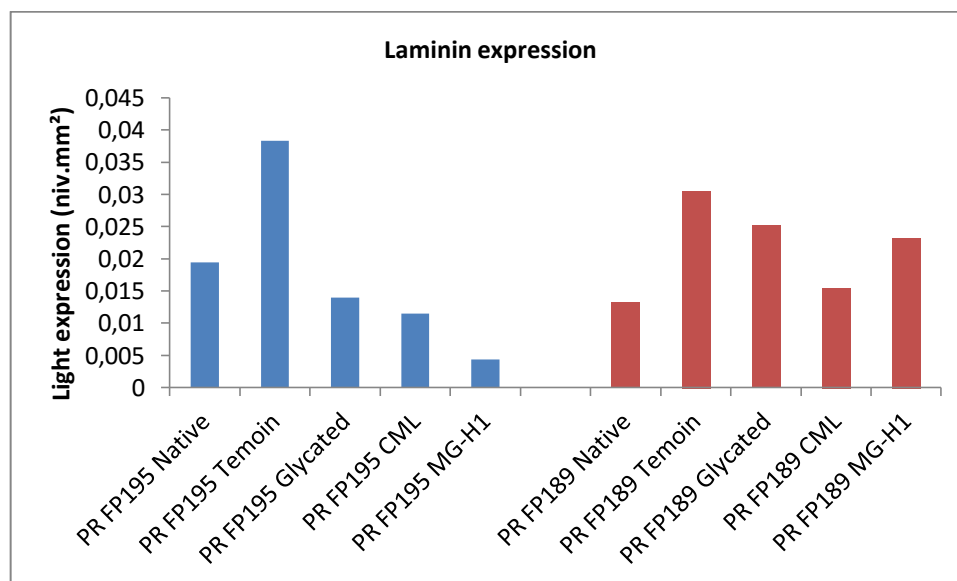
**Figure 14.** Tropoelastin expression in dermal equivalents containing fibroblasts from young and elderly donor after exposure to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M. Central zones of images from Figure 13 were used to quantify light intensity.

Concerning the reconstructed skins, we performed the immunoreactions for the detection of Laminin, Ki67 and Tropoelastin. The reactions to detect Ki67 and Tropoelastin in reconstructed skins were performed using the routine protocol, but we did not see a considerable protein expression.

The immunofluorescence detection of Laminin expression is shown in **Figure 15**, and the values obtained from these images are depicted in **Figure 16**.



**Figure 15.** Photomicrographs of reconstructed skins containing fibroblasts from young and elderly donor after exposure to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M, immunostained for the detection of Laminin. 100x magnification.



**Figure 16.** Laminin expression in reconstructed skins containing fibroblasts from young and elderly donor after exposure to CML 600 $\mu$ M or MG-H1 600 $\mu$ M. Only the central zones (basal membrane) of images from Figure 15 were used for light intensity quantification.

## 4 DISCUSSION

AGEs accumulation in skin affects proteins such as fibronectin, elastin and collagen (OYER et al., 1993; JEANMARIE et al., 2001; MIZUTARI et al., 1997). There are many recent studies exploring the effects of glycation induced by sugars in human skin cells and 3D models of dermis and full skin (Pageon et al., 2005; 2007; 2008; 2010; 2014). In this study, we proposed to study the effects of isolated AGEs in dermal fibroblasts and in 3D skin models.

The highest concentrations of isolated CML tested in cell culture in recent studies are close to 100,000  $\mu\text{g/L}$  (Zhu et al., 2012). A recent study showed that the maximum levels of CML in human serum of elderly patients is approximately 640  $\mu\text{g/L}$  (Semba et al., 2014). We tested a wide range of CML concentrations, from 0 to 600 $\mu\text{M}$  and, as we observed no cytotoxicity in cell viability by trypan blue assay, we chose the higher tested concentration (600 $\mu\text{M}$ ), which corresponds to 157895  $\mu\text{g/L}$ , for use in the subsequent assays. We performed the initial studies with MG-H1 at the same concentrations (200 $\mu\text{M}$ , 400 $\mu\text{M}$  and 600 $\mu\text{M}$ ) and we did not observe cytotoxic effects evaluated by trypan blue assay. Therefore, we performed the subsequent tests with MG-H1 also with the maximum tested concentration, 600 $\mu\text{M}$ .

Moreover, we performed the evaluation of senescence after successive passages of fibroblasts pre-exposed to CML and MG-H1. AGE exposure caused an increase of  $\beta$ -Gal positive (blue-stained) cells in culture. Our results are consistent with the article of Ravelojaona et al. (2009) and confirm the claim by several other authors that the Maillard reaction plays an important role in cell and tissue aging (Baynes et al., 2005, for review).

The monocyte chemotactic protein MCP-1 (CCL2), after activation by metalloproteinase 12 (MMP-12), is responsible for the recruitment of monocytes, memory T cells and dendritic cells to the site of inflammation. We evaluated the release of this

inflammatory mediator by ELISA and we saw an augmentation of MCP-1 levels caused by CML or MG-H1 exposure, however, this result was not homogeneous among the donors. Other soluble factors must be evaluated in order to correlate the increase in inflammatory profile with the exposure to AGEs.

Tropoelastins are water-soluble molecules that can covalently bind together with crosslinks to form the protein elastin, which. This protein is very prevalent in the body and is present in connective elastic tissue, allowing many tissues in the body, including skin, to resume their shape after stretching or contracting. We saw a decrease in Tropoelastin expression in papillary fibroblasts after treatment with CML 600 $\mu$ M and a remarkable increase in Tropoelastin expression caused by MG-H1 (600 $\mu$ M) treatment in both groups of fibroblasts donors cultured in monolayer. However, we did not observe the same effect in the 3D skin model, which may have occurred due to the protective role of the microenvironment.

In the 3D skin model, we observed that, in the glycated lattices (Glucose 200mM + Ribose 10mM) with cells from the young donor, there were differences in the contractive capacity and cell morphology. However, these changes were not observed in lattices incubated with CML or MG-H1.

## **5 CONCLUSION**

The glycation process is a complex phenomenon that involves many steps and results in numerous advanced glycation end products (AGEs). In this project, we tested two AGEs compounds, CML and MG-H1, in a wide range of concentrations and times of exposure. These synthetic AGEs, despite of not showing cytotoxic effects to fibroblasts, caused an augmentation in cell senescence, as expected, because it is known that the

glycation process is strongly related to aging. Surprisingly, we saw a stronger effect in senescence induction by MG-H1 treatment.

Moreover, we observed a change in Tropoelastin expression due to CML or MG-H1 treatment in fibroblasts cultured in monolayer, which indicates these products as potential target molecules in studies of loss skin elasticity loss (e.g. in solar elastosis) in elderly subjects.

However, no changes in inflammatory mediators or other ECM proteins expression were noted. It is possible that the isolated final AGEs, CML and MG-H1, are not sufficiently reactive to induce cell responses by themselves, remaining inactive when diluted in culture medium or immersed in collagen gels.

## 6 REFERENCES

AHMED MU, Thorpe SR, Baynes JW, Identification of N $\epsilon$ -carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein, J Biol Chem 261, 4889–4894, 1986.

AHMED N, Dobler D, Dean M and Thornalley PJ. Peptide Mapping Identifies Hotspot Site of Modification in Human Serum Albumin by Methylglyoxal Involved in Ligand Binding and Esterase Activity. JBC 280 (7), 5724–5732, 2005.

ASSELINÉAU D, Bernerd F, Fagot D, Pigeon H. Natural and photo-induced aging of the skin: the three dimensional culture approach. J Soc Biol, 197 (1), p. 63-64, 2003.

ASSELINÉAU D1, Pigeon H, Mine S. Fibroblast subpopulations: a developmental approach of skin physiology and ageing. J Soc Biol, 202 (1), p. 7-14. 2008.

BAIDOSHVILI A, Krijnen PA, Kupreishvili K, Ciurana C, Bleeker W, Nijmeijer R, Visser CA, Visser FC, Meijer CJ, Stooker W, Eijnsman L, Van Hinsbergh VW, Hack CE, Niessen HW, Schalkwijk CG. N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine depositions in intramyocardial blood vessels in human and rat acute myocardial infarction: a predictor or reflection of infarction? Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 2497–2503 2006.

BERNERD F and ASSELINÉAU D. Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB damages in skin reconstructed in vitro. Dev Biol 183, 123-138, 1997.

BERNERD F and ASSELINÉAU D. UVA Exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. Cell Death Differ 5, 792-802, 1998.

CAMPISI J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: The telomere connection. Exp Gerontol 36, 1619–1637, 2001.

CARRINO DA, Onnerfjord P, Sandy JD, Cs-Szabo G, Scott PG et al. Agerelated changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. J Biol Chem 278, 17566–17572, 2003.

CASTELLANI RJ, Perry G, Siedlak SL, Nunomura A, Shimohama S, Zhang J, Montine T, Sayre LM, Smith MA. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. Neurosci Lett 319, 25–28 2002.

CRISAN D, Lupsor M, Boca A, Crisan M, Badea R. Ultrasonographic assessment of skin structure according to age. Indian J Dermatol Venereol Leprol 78, 519, 2012.

CRISAN M, Taulescu M, Crisan D, Cosgarea R, Parvu A et al. Expression of Advanced Glycation End-Products on Sun-Exposed and Non-Exposed Cutaneous Sites during the Ageing Process in Humans. PLoS ONE 8 (10), e75003, 2013.

CRISTOFALO VJ and PIGNOLO RJ. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. Physiol Rev 73, 617–638, 1993.

DYER DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. J Clin Investig 91, 2463–2469, 1993.

FRANKE S, Dawczynski J, Strobe J, Niwa T, Stahl P, Stein G, Increased levels of advanced glycation end products in human cataractous lenses. J Cataract Refract Surg 29, 998–1004, 2003.

FU MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. J Biol Chem 271, 9982–9986, 1996.

GOLDSTEIN S. Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. Science 249, 1129–1133, 1990.

HAYFLICK L. The cell biology of aging. J Invest Dermatol. 73: 8–14, 1979.

HOFMANN B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C et al. Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? Exp Gerontol 48, 38–44, 2013.

JEANMAIRE C, Danoux L, Pauly G. Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an in vivo and in vitromodel study. Br J Dermatol 145, 10–18, 2001.

KAHARI VM, SAARIALHO-KERE U. Matrix metalloproteinases in skin. Exp Dermatol 6, 199–213, 1997.

KAJI Y, Usui T, Oshika T, Matsubara M, Yamashita H, Araie M, Murata T, Ishibashi T, Nagai R, Horiuchi S, Amano S. Advanced glycation end products in diabetic corneas, Invest. Ophthalmol Vis Sci 41, 362–368, 2000.

KAWABATA K, Yoshikawa H, Saruwatari K, Akazawa Y, Inoue T, Kuze T, Sayo T, Uchida N, Sugiyama Y. The presence of N $\epsilon$ -(Carboxymethyl) lysine in the human epidermis. Biochimica et Biophysica Acta 1814, 1246–1252, 2011.

KOVACS D, Raffa S, Flori E, Aspate N, Briganti S, Cardinali G, Torrisi MR, Picardo M. Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. J Dermatol Sci 54, 106–113, 2009.

LAVKER RM, Zheng P, Dong G. Aged skin: A study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. J Invest Dermatol 88, 44–51, 1987.

MATSUMOTO K, Fujiwara Y, Nagai R, Yoshida M. Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in human bladder with specific monoclonal antibody. Int J Urol 16, 402–405, 2009.

MINE S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. PLoS ONE 3 (12), e4066, 2008.

- MIZUTARI K, Ono T, Ikeda K, Kayashima K, Horiuchi S. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. J Invest Dermatol 108, 797–802, 1997.
- MONTAGNA W, Carlisle K. Structural changes in aging human skin. J Invest Dermatol 73, 47–53, 1979.
- PAGEON H, Asselineau D. An in vitro approach to the chronological aging of skin by glycation of the collagen: the biological effect of glycation on the reconstructed skin model. Ann N Y Acad Sci 1043, p. 529–532, 2005.
- PAGEON H, Bakala H, Monnier VM, Asselineau D. Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro. Eur J Dermatol 17 (1), 12–20, 2007.
- PAGEON H, Técher MP, Asselineau D. Reconstructed skin modified by glycation of the dermal equivalent as a model for skin aging and its potential use to evaluate anti-glycation molecules. Exp Gerontol 43, 584–588, 2008.
- PAGEON H. Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. Pathol Biol (Paris) 58 (3), p.226–231, 2010.
- PAGEON H, Zucchi H, Asselineau D. Distinct and complementary roles of papillary and reticular fibroblasts in skin morphogenesis and homeostasis. Eur J Dermatol 22 (3), 324–332, 2012.
- PAGEON H, Zucchi H, Rousset F, Monnier VM, Asselineau D. Skin aging by glycation: lessons from the reconstructed skin model. DOI 10.1515/cclm-2013-0091 Clin Chem Lab Med 52 (1), 169–174, 2014.
- PAGEON H, Zucchi H, Dai Z, Sell DR, Strauch CM, Monnier VM, Asselineau D. Biological Effects Induced by Specific Advanced Glycation End Products in the Reconstructed Skin Model of Aging. BioResearch Open Access 4 (1), p. 54–64, 2015.
- POSTLETHWAITE AE, Kang AH. Fibroblasts and matrix proteins. In: Gallin JI, Snyderman R, eds. Inflammation: basic principles and clinical correlates. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. 227–257, 1999.
- RAVELOJAONA V, Robert AM, Robert L. Expression of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) by human skin fibroblasts, effect of advanced glycation end-products and fucose or rhamnose-rich polysaccharides. Archives of Gerontology and Geriatrics 48, 151–154, 2009.
- REENSTRA WR, Yaar M, Gilchrist BA. Effect of donor age on epidermal growth factor processing in man. Exp Cell Res 209, 118–122, 1993.
- RITTIE L and FISHER GJ. Isolation and culture of skin fibroblasts. In: Varga J, ed. Methods in Molecular Medicine: Fibrosis Research: Methods and Protocols. Totowa: Human Press. 83–98, 2005.
- SEMBA RD, Cotch MF, Gudnason V, Eiríksdóttir G, Harris TB, Sun K, Klein R, Jonasson R, Ferrucci L, Schaumberg DA. Serum Carboxymethyllysine, an Advanced Glycation End Product, and Age-Related Macular Degeneration The Age, Gene/Environment Susceptibility–Reykjavik Study. JAMA Ophthalmol 132 (4), p. 464–470, 2014.
- SCHNEIDER EL. Aging and cultured human skin fibroblasts. J Invest Dermatol 73, 15–18, 1979.
- SMITH JR, Pereira-Smith OM, Schneider EL. Colony size distributions as a measure of in vivo and in vitro aging. Proc Natl Acad Sci USA 75, 1353–1356, 1978.
- SMITH RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. Am J Pathol 151, 317–322, 1997.
- TANJI N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'Agati VD. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. J Am Soc Nephrol 11, 1656–1666, 2000.



THORNALLEY P J, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babai-Jadidi R and Dawnay A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. Biochem J 375, 581–592, 2003.

VARANI J, Dame MK, Rittie L, Fligel SEG, Kang S et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. Am J Pathol 168: 1861–1868, 2006.

ZHU J, Yang K, Jing Y, Du R, Zhu Z, Lu L and Zhang R. The effects of low-dose Nepsilon-(carboxymethyl) lysine (CML) and Nepsilon-(carboxyethyl)lysine (CEL), two main glycation free adducts considered as potential uremic toxins, on endothelial progenitor cell function Cardiovascular Diabetology 11 (90), 2012.

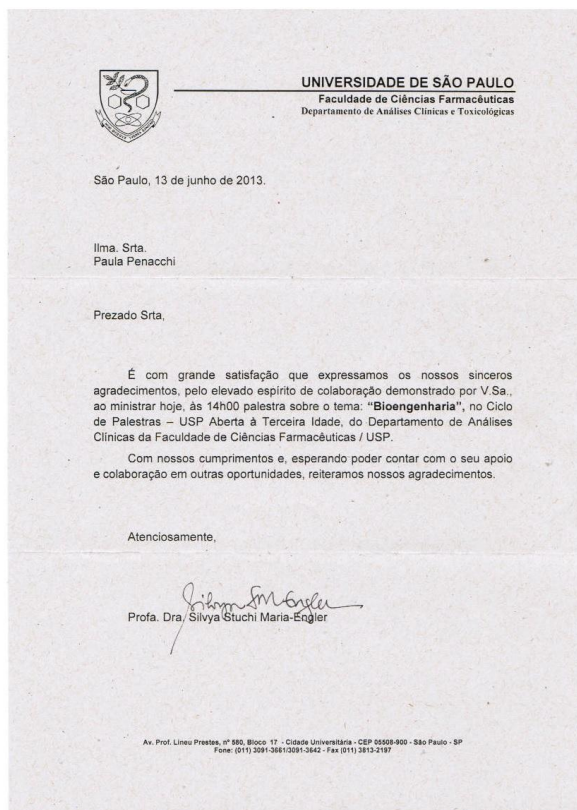
WELLS-KNECHT KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. Biochemistry 34, 3702–3709, 1995.

WEST MD, Pereira-Smith OM, Smith JR. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. Exp Cell Res 184, 138–147, 1989.

YAAR M and ELLER MS. Mechanisms of aging. Arch Dermatol 138, 1429–1432, 2002.

YOSHIDA S, Yamada K, Hamaguchi K, Nishimura M, Hatakeyama E, Tsuchida H, Sakamoto K, Kashiwabara H, Yokoyama T, Ikeda K, Horiuchi S. Immunohistochemical study of human advanced glycation end-products (AGE) and growth factors in cardiac tissues of patients on maintenance dialysis and with kidney transplantation, Clin Nephrol 49, 273–280, 1998

## Anexo IV – Certificados de Participação em Eventos



1/27/2014 1:05:42 PM

SOT | Contemporary Concepts in Toxicology

### Abstract Submissions

#### FutureTox II Meeting Abstracts

#### PDF on Demand

This PDF includes your preselected abstract submission detail and documentation in a simple and convenient format. Review electronically or print and review in hard copy.

## FUTURETOX II

PATHWAYS TO PREDICTION

### FutureTox II: *In Vitro* Data and *In Silico* Models for Predictive Toxicology

**January 16–17, 2014**  
Friday Center at the University of North Carolina  
Chapel Hill, North Carolina

Contact:  
SOT Headquarters  
1821 Michael Faraday Drive, Suite 300 | Reston, VA 20190 USA  
Tel: 703.438.3115 | Fax: 703.438.3113 | Email: sothq@toxicology.org  
Website: www.toxicology.org/cct

This information is intended only for the person(s) to whom it was created and may contain information that is privileged, confidential, or otherwise protected from disclosure. Dissemination, distribution, or copying of this PDF or the information herein by anyone other than the intended recipient(s) is prohibited.

SOT Abstract

Poster No: 17

#### Artificial Skin in Perspective of Alternative Methods to Animal Experimentation in Brazil

Silvyia Stuchi Maria-Engler<sup>1</sup>, Ana Paula Immitah<sup>2</sup>, Andréa C. Frust<sup>1</sup>, Bianca Ferracini<sup>2</sup>, Catelina Cazarino<sup>1</sup>, Debora K. Alves<sup>1</sup>, Fernanda Flores<sup>1</sup>, Kely Tarta<sup>1</sup>, Maria Clara Crepaldi<sup>1</sup>, Luiz Henrique Catalani<sup>2</sup>, Manoela Santini<sup>1</sup>, Natalia Tamachini<sup>1</sup>, Octavio Gomes<sup>1</sup>, Patricia Casari<sup>1</sup>, Paula Penacchi<sup>1</sup>, Renato Massaro<sup>1</sup>, Tatiana Pedrosa<sup>1</sup>, Silvia Romano<sup>1</sup>, Silvyia Sander<sup>1</sup>, Thalita Zanoni<sup>1</sup>, Silvyia B.M. Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Skin Biology Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup> Institute of Chemistry University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Reconstitute the architecture of the human skin can supply a reliable basis for studying cell-cell and cell-stroma interactions in the regulation of melanogenesis, proliferation, and differentiation of keratinocytes, as well as re-epithelialization processes after wounding, photoaging, and cancer models. We developed the reconstruction of artificial human skin in a 3D setting, including both dermal and epidermal components, e.g., glycosylated dermis simulating aged and diabetic skin and reconstruction of human corneum on a polymeric membrane to be used as graft. Using HaCat cells on the top of dermal equivalent, we were able to test toxicity of hair dye molecules. Human skin equivalents can be engineered with specific genetic alterations in either dermal or epidermal compartments to determine how the outcome of these modifications may be modulated by the stromal environment. In this context we are including melanoma in the reconstructed skin to study cancer invasiveness and the effects of different drugs and also immune cells were included in the skin with melanoma allowing studies of toxicity and inhibition of invasion. Reconstituting just the dermal compartment we assessed the protective effect of the microenvironment upon drug treatment. Our lab at University of São Paulo is involved in this productive chain using artificial reconstructed skin as an alternative method.

Primary Category: New *In Vitro* Models

**XVIII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**  
**5º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas**

**Certificado**

Certificamos que o trabalho **"AGED SKIN MODEL WITH GLYCATED DERMIS AS PLATFORM TO EVALUATE ANTI-GLYCATION COMPOUNDS"** (FCF138), de autoria de Paula Pennacchi (PG), Maria Clara Crepaldi (IC), Octávio Gomes (IC), Maira Estanislau de Almeida (PG)\*, Marinilce Fagundes dos Santos\*, Silvia Berlanga de Moraes Barros, Silvy Stuchi Maria-Engler, foi exposto no 5º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, realizado no período de 21 a 25 de outubro de 2013, durante a XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.

São Paulo, Outubro de 2013.

Prof. Thomas Paves Ong  
Presidente da Comissão Organizadora

Profª. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
Diretora da RCF/USP

**Theme X – Additional sessions**

**Coordinators**  
Dagmar Jirová, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic  
Horst Spielmann, FU Berlin, Germany

**Session X-1: Young Scientists Travel Award Short Presentations**

**Co-chairs**  
Lucia Li, The Chinese University Hong Kong, Hong Kong  
Manfred Liebisch, Foundation SET, Germany

**Session X-1: Oral presentations**

**X1-152 \*  
Emulating the human vasculature in a multi-organ-chip platform**

T. Hasenberger<sup>1</sup>, E.-M. Materna<sup>1</sup>, K. Schimke<sup>1</sup>, S. Bauer<sup>1</sup>, S. Brincker<sup>1</sup>, A. Lorenz<sup>1</sup>, R. Lauster<sup>1</sup> and U. Marx<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Medical Biotechnology, Technische Universität Berlin, Berlin, Germany; <sup>2</sup>Multi-Organ-Chip, TissUse GmbH, Spreenhagen near Berlin, Germany  
t.hasenberger@tu-berlin.de

Our multi-organ-chip (MOC) platform contributes to the ongoing development of *in vitro* substance testing systems with the ultimate aim to replace animal models. It comprises two independent circulatory networks at the scale of a microscope glass slide. Onchip micro-pumps provide pulsatile circulation – enough to support microcler amounts of human tissue constructs in defined cultivation cavities. Each circuit contains 600 µl of volume, only, enabling anaerobic and paracrine crosstalk through the enriched medium.

In a sub-systemic testing structure, like our MOC, artificial vessels are vitally important. In particular an endothelial barrier within the chip potentially interacts with medium constituents and regulates their diffusion into subjacent tissue. Recreating *in vivo* conditions, first, the flow behaviour was analysed and optimised using particle image velocimetry (PIV). Upon seeding into the channel-structures human dermal microvascular endothelial cells (HIDMECs) exhibit proper elongation and orientation within four days induced by the flow shear stress. The cells were dynamically cultivated for up to 40 days. Data of the colonisation and the viability of the endothelial cell layer will be presented as well as functional staining of CD31, von Willebrand factor, and VE-cadherin. Further developments to facilitate a real perfusion of introduced organoids (e.g., liver) will be addressed.

\* Supported by Young Scientists Travel Awards provided by ACT Germany and the German Foundation SET.

**X1-186 \*  
A 3D culture system for investigating inflammatory responses in human lung**

S.S. Hugel<sup>1</sup>, H. Harrington<sup>1</sup>, J. W. Haycock<sup>2</sup>, J. Aylott<sup>1</sup> and A.M. Ghahremanlou<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Division of Immunology, Faculty of Medicine and Life Sciences, University of Nottingham, Nottingham, UK; <sup>2</sup>Kroto Research

Institute, University of Sheffield, Sheffield, UK; <sup>2</sup>School of Pharmacy, University of Nottingham, Nottingham, UK  
s.hugel@nottingham.ac.uk

Respiratory inflammatory diseases are amongst major causes of morbidity and mortality worldwide. Lung fibroblasts have been shown to play a key role in local immune responses during inflammation. However, the role of molecular pathways such as nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activation in human have remained elusive partly due to the limited physiological relevance of animal models and lack of biometric *in vitro* models. We have developed a 3D culture of lung fibroblasts on porous electrospon fibres resembling human lung matrix. In order to investigate NF- $\kappa$ B activation in response to pro-inflammatory stimuli, we developed two detection systems based on nuclear localisation of p65 subunit and release of a soluble luciferase reporter construct. Using these systems, we can detect NF- $\kappa$ B activation in response to TNF- $\alpha$  in dose dependent manner with high sensitivity. Interestingly the 3D model remained responsive to TNF- $\alpha$  at higher concentration (20 ng/ml) whereas 2D culture controls reached a plateau at 10 fold lower concentration. The dynamic range of responses in 3D cultures reflects a more *in vivo* like physiologic receptor expression and cytokine profile. We therefore believe our 3D culture detection system provides a sensitive and biologically relevant tool for studying the regulation of NF- $\kappa$ B activation in lung fibroblasts.

\* Supported by Young Scientists Travel Awards provided by ACT Germany and the German Foundation SET.

**X1-250 \*  
In vitro skin corrosion as a pre-validation study of Reconstructed Human Epidermis in drug developed**

C. Catarino, P. Pennacchi, T. Pedrosa, S. Barros and S. Maria-Engler  
Clinical Chemistry and Toxicology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil  
carolinscattarino@gmail.com

Currently there is a strong global trend towards the development of *in vitro* tests to replace the use of animals in safety evaluation tests. In Brazil, this practice is in progress and should be quickly implemented meeting the international humanitarian concepts. In the present study we developed a model of Reconstructed Human Epidermis (RHE), which consists of a differentiated three-dimensional epidermal tissue reconstructed from normal human keratinocytes in a chemically de-

**THEME X, SESSION X-1**

defined medium and air liquid interface growth. To validate the model, it was tested for skin corrosion, following the principles of the Guide 431 (Organisation for Economic Cooperation and Development – OECD). Four substances from the list indicated in the Guide 431 were tested, two corrosive references (Lactic Acid and Octanoic Acid) and two non corrosive references (Benzylacetone and Lauric Acid), as well as positive and negative controls. The results show that three of four substances (Lauric Acid, Lactic Acid and Octanoic Acid) and the controls could be classified in the expected categories of the Guide 431. Therefore, we demonstrated the potential of our RHE model as a test method relevant and reliable and may be used for research and chemical risk assessment.

**References**  
Alipour, N., Granddier, M. H. and Cotovio, J. (2014). *Toxicol In Vitro* 28, 131-145.  
Alipour, N. et al. (2014). *Toxicol In Vitro* 28, 616-625.  
Bibben, C. A. et al. (2011). *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 25-30.  
OECD (2013). OECD TG 431. OECD, Paris. <http://www.oecd.org/env/biobaselines>  
Tortore, C., Rouquet, M., Fraissinette Ade, B. (2010). *Toxicol In Vitro* 24, 1379-1385.

\* Supported by Young Scientists Travel Awards provided by ACT Germany and the German Foundation SET.

**X1-276 \*  
Biotransformation of testosterone and 2,4-toluenediamine by human skin and reconstructed tissues**

L. Grolmann, W. Klipper, M. Schaffer-Korring and G. Weindl  
Institute of Pharmacy (Pharmacology and Toxicology), Freie Universität Berlin, Berlin, Germany  
lisa.grolmann@fu-berlin.de

Reconstructed human skin (RHS) gains increasing interest in preclinical drug development, but as with human skin, knowledge about biotransformation capacity is rather poor although this can be highly relevant for genotoxicity and sensitization testing. We compared the metabolism of the standard compound testosterone and the industrial chemical 2,4-toluenediamine (2,4-TDA) in excised human skin, RHS (PhenolPT, EpiDermPT) and undifferentiated keratinocytes and fibroblasts.

Biotransformation of radiolabelled testosterone was determined by HPLC coupled to a radio detector and 2,4-TDA and its metabolites were quantified by HPLC-UV.  
Testosterone and 2,4-TDA metabolism by RHS exceeded biotransformation by human skin, yet, the metabolite profile was close. The mono-N-deethylated derivative N-(2-Amino-4-methylphenyl)acetamide was the only metabolite of 2,4-TDA found in all test matrices and the formation ranked as: RHS > human skin > keratinocytes > fibroblasts.

Metabolism of testosterone and 2,4-TDA in human skin tissues is dominated by phase I and phase II reactions, respectively. Reconstructed tissues appear to be an adequate test matrix for the investigation of cutaneous metabolism of xenobiotics and thus can be used for non-clinical drug development as well as the investigation of biotransformation-related toxicological endpoints.

\* Supported by Young Scientists Travel Awards provided by ACT Germany and the German Foundation SET.

**X1-434 \*  
In vitro models for neuroimmunological diseases**

S.M. Buzin, F. A. Zulkewijk-Sick, J. Veth, C. van der Putter, A.E. J. Jong, P.M. Wiers and J.J. Bajramovic  
Unit Alternatives, Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, The Netherlands  
buzin@bprc.nl

Activation of the immune system is a common hallmark of neurodegenerative diseases as Multiple Sclerosis and Alzheimer's disease. This involves responses generated by the innate immune system within the central nervous system (CNS) and cross-talk of the CNS with cells of the peripheral adaptive immune system. Various non-human primate (NHP) *in vivo* models are available to study neuroimmunological involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. However, these models are associated with considerable discomfort to the animals. We aim to complement these models and to finally reduce and replace their use by *in vitro* models. We have developed various NHP *in vitro* models including organotypic brain slice cultures, mixed glia cell cultures, dissociated primary glia cell cultures, and co-cultures of glia cells with cells of the adaptive immune system. These cultures are all initiated from surplus brain tissue that becomes available from other experiments.

The advantages and disadvantages of NHP *in vitro* CNS models compared to other available *in vitro* models will be discussed as well as their relevance for human diseases. Furthermore, data will be presented on the use of these models as pre-screening tool for *in vivo* drug testing and to mimic different aspects of neurodegenerative diseases *in vitro*.

\* Supported by Young Scientists Travel Awards provided by ACT Germany and the German Foundation SET.

**X1-445 \*  
Human in vitro adipogenesis assay for testing modulators of adipogenesis**

Q. Hiltala<sup>1</sup>, J. R. Sarkinen<sup>1</sup>, T. Ylikomi<sup>2</sup> and T. Heiskanen<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>RiikAM, University of Tampere, Tampere, Finland; <sup>2</sup>Cell biology, University of Tampere, Tampere, Finland  
out.hiltala@uta.fi

According to WHO, 1.6 billion adults are overweight, and at least 400 million obese, and numbers are increasing annually. Therefore, there is a lot of interest to study effects of chemicals on adipose tissue and to develop drugs that inhibit adipogenesis. However, animal models currently used to mimic human adipose tissue metabolism correlate poorly with human.

We have developed a novel human *in vitro* adipogenesis assay for testing the effects of chemicals on adipogenesis. Our model consists of human adipose stem cells (hASC) which are differentiated with adipose tissue extract (ATE) (Sarkinen et al., 2012). ATE is cytokine rich isolation which contains the major adipocytokines and induces differentiation of hASC towards adipocytes.

The performance of the assay was tested with substances that effect adipogenesis. Evodimine, 4-hydroxy-temog, Bromelain, sodium-mono-ascorbate, roxatrolol, GW627368 and T0070907 showed strong dose-dependent adipogenesis inhibition in the assay. The anti-adipo-



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



## XX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

I. Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica  
7º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas  
XV Campanha de Diabetes

# CERTIFICADO

Certificamos que **PAULA COMUNE PENNACCHI** apresentou o resumo “*Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study Pathogenesis of Skin Aging*”, de autoria de Paula Comune Pennacchi, Maíra Estanislau Soares de Almeida, Octávio Luís Alves Gomes, Fernanda Faião Flores, Maria Clara de Araújo Crepaldi, Marinilce Fagundes dos Santos, Silvia Berlanga de Moraes Barros e Silvy Stuchi Maria-Engler, em forma de pôster no dia 06 de outubro de 2015, na XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 05 a 09 de outubro de 2015.

São Paulo, 09 de outubro de 2015.

  
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho  
Presidente da Comissão Organizadora

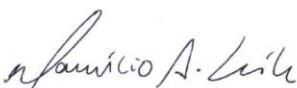
# IX ENCIVI


Recursos Naturais, Novas Tecnologias e  
Ética Profissional

# Certificado

Certificamos para os devidos fins que **PAULA COMUNE PENNACCHI**, ministrou a palestra A cultura celular e a reconstrução de pele humana para prospecção de novos fármacos, durante o IX ENCONTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA, com carga horária de duas horas, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

Ilha Solteira, 23 de junho de 2015

  
Prof. Dr. Maurício Augusto Leite  
Presidente do IX ENCIVI

  
Rogério Oliveira Rodrigues  
Diretor UNESP Campus de  
Ilha Solteira

unesp 



## Certificate of Participation

07/25/2015

Silvia Maria-Engler  
University of São Paulo  
Avenida Lineu Prestes, 580 bloco 17 sala 114  
São Paulo, 05508000  
Brazil

**This is a certificate of participation for:**  
Conference: Biomaterials & Tissue Engineering  
Dates: 07/19/2015 - 07/24/2015  
Location: Melia Golf Vichy Catalan Business and Convention Center in  
Girona Spain

This letter certifies your participation as a Poster Presenter at the Gordon Research Conference on Biomaterials & Tissue Engineering held 07/19/2015 - 07/24/2015 at Melia Golf Vichy Catalan Business and Convention Center in Girona Spain.

Presented poster titled: Glycated reconstructed HUMAN SKIN AS A PLATFORM TO STUDY OF SKIN AGING Pathogenesis"

Nancy Ryan Gray, PhD, President and Chief Executive Officer  
Gordon Research Conferences



---

\*Please [notify us](#) if you are not the intended recipient of this email.





unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu  
Instituto de Biociências de Botucatu



## CERTIFICADO

*Certificamos que a Profa. Dra. **PAULA COMUNE PENNACCHI** proferiu palestra intitulada "**Peles artificiais para tratamento de câncer**" durante a Disciplina de Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências, UNESP - Campus de Botucatu.*

Botucatu, 15 de abril de 2013.

Herivaldo Mota Santos  
Supervisor da Seção Técnica de Pós-Graduação

# Anexo V – Termo de Outorga FAPESP

FAPESP

Processo: 2011/22812-1  
 Data impressão: 13/02/2015 17:17:50  
 Folha: \_\_\_\_\_  
 Volume: \_\_\_\_\_  
 Rubrica: \_\_\_\_\_

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
**ADITIVO AO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE BOLSAS NO PAÍS**  
 PROCESSO 2011/22812-1

FAPESP

Processo: 2011/22812-1  
 Data impressão: 13/02/2015 17:17:50  
 Folha: \_\_\_\_\_  
 Volume: \_\_\_\_\_  
 Rubrica: \_\_\_\_\_

**ANEXO I: Relação dos Benefícios e Materiais Concedidos**

Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, resolve alterar o Termo de Outorga nos termos a seguir especificados, mantidas as cláusulas das "Condições Gerais de Concessão de Benefícios" anteriormente firmadas.

<b>1. OUTORGADOS</b>	
<b>1.1 BOLSISTA:</b>	Paula Comune Pennacchi CPF: 074.787.246-55 RG: 14035924-SSP/MG
<b>1.2 ORIENTADOR/SUPERVISOR:</b>	Silvia Stuchi Maria-Engler CPF: 181.571.778-55 RG: 176200769-SSP/SP
<b>2. Correspondência</b>	
<b>2.1 BOLSISTA:</b>	A/C Paula Comune Pennacchi, Rua Antônio Gotardelo Sobrinho, n 251 - casa, Jardim Antonieta, Monte Sião/MG, CEP 37580-000 paulapennacchi@gmail.com
<b>2.2 ORIENTADOR/SUPERVISOR:</b>	Av Lineu Prestes, 580 - Bloco 17 Sala 114, Cidade Universitária, São Paulo/SP, CEP 05508-900 silvia@usp.br
<b>3. Instituição Sede:</b>	Faculdade de Ciências Farmacéuticas/FCF Universidade de São Paulo/USP
<b>4. Projeto de Pesquisa:</b>	DESENVOLVIMENTO DE PELE ARTIFICIAL CONTENDO EQUIVALENTE DÉRMICO GLICADO MIMETIZANDO A FISIOPATOLOGIA DA PELE ENVELHECIDA E DIABÉTICA
<b>5. Linha de Fomento:</b>	Programas Regulares / Bolsas / No País / Doutorado
<b>6. Área/Subárea:</b>	Morfologia Citologia e Biologia Celular
<b>7. Coordenação:</b>	Biologia II
<b>8. Período da vigência:</b>	01/03/2012 a 26/02/2016
<b>9. Relatórios Científicos:</b>	10/02/2013, 10/02/2014, 10/09/2014, 10/10/2014, 10/03/2016
<b>10. Prestações de Contas:</b>	10/02/2013, 10/02/2014, 10/09/2014, 10/10/2014, 10/03/2016
<b>11. Entrega da Ata de Defesa:</b>	15/09/2016

<b>Reserva Técnica no País</b>
Reserva técnica equivalente a 30,00% do valor anual da bolsa.
<b>Mensalidade de Bolsas no País</b>
30 mensalidades de manutenção para o bolsista, conforme tabela FAPESP. - 6 mensalidades de DR-1 - 24 mensalidades de DR-2 12 mensalidades de manutenção para o bolsista, conforme tabela FAPESP. - 12 mensalidades de DR-2

<b>Observações</b>
- Concessão improrrogável.

Alterações na Concessão	
Data	Descrição
17/07/2014	SM 004 - Renovação de Bolsa Fica autorizada a renovação da bolsa em 12 (doze) mensalidades, com início em 01/09/2014 e término previsto para 31/08/2015.
10/09/2014	SM 005 - Interrupção de Processo
12/02/2015	SM 006 - Reativação de Processo Fica autorizada a reativação da bolsa em 11 mensalidades e 21 dias, com início em 06/03/2015 e término previsto para 26/02/2016. O período de vigência da bolsa é de 01/03/2012 a 09/09/2014 e de 06/03/2015 a 26/02/2016.

"Via para o bolsista"

FAPESP

São Paulo, 13 de fevereiro de 2015

Outorgado(s) \_\_\_\_\_  
 Bolsista \_\_\_\_\_  
 Orientador ou Supervisor \_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Terézinha de Jesus Andreoli Pinto**  
 Diretora - FCF/USP  
 N.º Func. 73242  
 Faculdade de Ciências Farmacéuticas/FCF/USP

Outorgante \_\_\_\_\_  
 Ascenção Bela Antonio Molinari  
 Por Procuração \_\_\_\_\_  
 Joaquim José de Camargo Engler  
 Diretor Administrativo

**Anexo VI – Ficha do Aluno (JANUS – USP) e Currículo Lattes**