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

**Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo
transwell e membrana biopolimérica**

Carolina Motter Catarino

SÃO PAULO
2015

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

**Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo
transwell e membrana biopolimérica**

Carolina Motter Catarino

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

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

SÃO PAULO
2015

Carolina Motter Catarino

**Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo
transwell e membrana biopolimérica**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler
orientadora/presidente

Maria Beatriz Puzzi
1º examinador

Luciana Biagini Lopes
2º examinador

São Paulo, 11 de Maio de 2015.

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

Catarino, Carolina Motter
C357d Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana
do tipo transwell e membrana biopolimérica / Carolina Motter
Catarino. -- São Paulo, 2015.
116p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Bioquímica clínica 2. Avaliação de risco 3. Biopolímeros
4. Pele artificial I. T. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientador.

616.0756 CDD

Dedicatória

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pelo amor e pelo exemplo. Vocês me ensinaram que o trabalho e a dedicação são a chave para o sucesso e conquista dos sonhos.

À minha querida e corajosa irmã pelo estímulo. Que você se apaixone pela ciência assim como eu.

Dedicatória

Ao amor da minha vida, Thiago Villas Bôas Zanelatto, por toda a paciência e compreensão do mundo, por acreditar e confiar em mim e nos meus sonhos.

Agradecimentos

Essa tese foi construída com muita dedicação e esforço. Mas eu jamais teria conseguido conquistar todos esses resultados e crescimento pessoal sem as pessoas que encontrei pelo caminho. Por isso eu agradeço a:

À Professora Silvy Stuchi Marian-Engler, minha orientadora neste projeto, por ter me recebido com tanta empolgação em seu laboratório e por ter confiado a mim um projeto de tamanha importância. Eu a admiro muito por toda a sua dedicação à ciência e o seu comprometimento com seus alunos e com a Universidade. Eu agradeço pelas palavras de incentivo, mas agradeço ainda mais pelos puxões de orelha, são eles que me moldarão para ser uma grande cientista um dia como a senhora. E claro, eu não poderia deixar de agradecer-lá por me ajudar a conquistar o meu sonho do doutorado fora do país, desde a primeira carta de recomendação à correção da tese no fim de semana do seu aniversário e às vésperas de uma grande reunião na Fapesp. Serei eternamente grata por todo este apoio e espero um dia poder retribuir como colega de ciência e sempre deixa-la muito orgulhosa.

À Professora Silvia Berlanga por enriquecer meus conhecimentos sobre métodos alternativos e toxicologia. Conversar com a senhora é sempre abrir a cabeça para um mundo de novas ideias, e isso sempre fará diferença na minha vida de cientista. Obrigado por me ajudar a conquistar o meu sonho de estudar fora. E muito obrigado pelo melhor mapple sirup que já degustei na minha vida.

Ao Professor Luiz Henrique Catalani pela parceria no desenvolvimento desta tese. Eu lhe agradeço por abrir as portas do seu laboratório e por guiar as discussões sobre o papel das membranas biopoliméricas como suporte celular.

À doutoranda Mariana Burrows por me ensinar a gerar membranas eletrofiadas, e por vezes por tê-las gerado pessoalmente, em especial nos seus últimos momentos no Brasil. Desde já agradeço sua contribuição para a redação do artigo sobre a geração de epiderme equivalente sobre membranas biopoliméricas.

I thank Professor Dr. Panjah Karande at Rensselaer Polytechnic Institute for encouraging me and for helping me reach my next dream.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

À Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

À Silvia Romano pela paciência interminável, pela compreensão, pelos litros de meio de cultura, pelo companheirismo e pelo carinho. Obrigado por ter sido uma mãe para mim nesses dois anos de laboratório. Se eu pudesse eu deixava aqui gravado o meu suspiro cada vez que algo acontecia...para o resto da vida, quando suspirar vou lembrar de você.

À Paula Comune Pennacchi por todo o treinamento. Obrigado por ter sido responsável pela base da minha formação técnica de cientista e por me ajudar a construir esta dissertação. Se eu me desesperei, você conseguiu me fazer acreditar que tudo daria certo. Obrigado por me deixar reviver meus dias de Paris na sua viagem.

À Thalita pela parceria no laboratório e fora dele. Obrigado por ter me adotado, e cuidado de mim como uma irmã mais velha. Por sua causa São Paulo ficou mais divertida.

À Fernanda pelo apoio das horas difíceis do trabalho. Quando parecia não haver solução você sempre aparecia com um efeito hormésis para explicar tudo. E obrigado pela parceria nas horas mais famintas.

À Bianca pelas inúmeras correções ao meu inglês. Obrigado por me ajudar a chegar ao meu próximo sonho. Obrigado por não criticar minha relação com a comida.. *só que não*.. eu sempre lembrarei com muito carinho das nossas discussões gastronômicas.

À Michele por partilhar sua experiência de vida comigo. Obrigado pelos provérbios e dizeres da interior de Minas, por sempre me fazer rir e por zelar pela minha alimentação.

À minha amiga Silvana, por quem eu tenho um carinho imenso. Obrigado por me deixar sua bancada. Eu acho que me deu muita sorte, e obrigado por sempre me fazer sentir tão bem quista.

À Manoela por me inspirar. Quando vi você na primeira reunião de laboratório, discutindo com tanta categoria a apresentação de nossos colegas eu pensei: “Um dia que quero ser tão inteligente como ela”. Obrigada pela companhia das compras pós pagamento, por me fazer rir tantas vezes e por verdadeiramente ficar feliz com as minhas conquistas.

À Débora pela paciência em me ensinar as coisas inúmeras vezes. Eu nunca mais esquecerei como calibrar uma balança. Talvez eu esqueça ... então, eu sei, que com seu enorme coração, não importa onde eu esteja no mundo, você sempre me ajudará.

Ao colega mais querido do mundo, Renato. Ops, agora já somos amigos. Obrigado pelo apoio, por tomar minhas dores e por fazer sentir protegida.

À Andreia pela incrível capacidade e paciência em ensinar novas metodologias Seu conhecimento profundo em qualquer experimento que faça é inspirador. Obrigador por checar meus cálculos incontáveis vezes.

Ao Octavio por cuidar das minhas imagens, por aperfeiçoar meus esquemas e por ser parceiro nos fibroblastos. Um dia eu te pago os chocolates que você merece por toda a ajuda que me deu.

À Erica por me mostras que é possível ser uma ótima cientista e se vestir com categoria.

À Tatiana por partilhar os sofrimentos e realizações de desenvolver a epiderme equivalente.

À Nayane por resolver as questões químicas que me faltam. Obrigado por me fazer menos sozinha na categoria de mestranda, foi por pouco tempo, mas com certeza nos tornamos a categoria mais forte.

Ao Gustavo por me divertir com sua timidez.

À Jozira, a senhora que sempre foi uma segunda mãe para mim. Obrigado por ter cuidado de mim todos esses anos e por ter continuado a cuidar de mim mesmo quando eu já não estava mais debaixo das suas asas. Obrigado por cuidar da minha roupa e pelas comidinhas maravilhosas.

À minha irmã por ser a melhor irmã do mundo. Obrigado por me emprestar as suas roupas, obrigado por fazer brigadeiro para mim, obrigado por colorir minha vida. Obrigado por ter deixado minha vida mais alegre.

Aos meus pais por terem me educado a ser quem eu sou hoje. Eu não tenho palavras para mostrar o quão grata eu sou à vocês por tudo. Vocês são minha motivação e inspiração, meu norte e meu sul, meu conforto e minha certeza de que se fizer como vocês tudo dará certo. Vocês tornaram todos os meus sonhos possíveis e eu sei que eles não são meus, são nossos. OBRIGADO!

Ao meu grande e eterno amor, Thiago. Você faz de mim uma pessoa muito melhor. Obrigado por me apoiar durante o mestrado, não foi fácil para nós ficar mais uma vez longe. Obrigado por apoiar todos os meus sonhos e por fazer parte deles.

"Tenho em mim todos os sonhos do mundo."

Fernando Pessoa

RESUMO

Catarino, C. M. **Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo *transwell* e membrana biopolimérica**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Atualmente existe uma forte tendência mundial para o desenvolvimento de testes *in vitro* que supram o uso de animais em ensaios de avaliação de segurança. Em 1986 a Diretiva Europeia 86/609/EEC induziu a discussão mundial de redução de testes em animais e a 7ª emenda desta Diretiva, publicada em 2004, determinou a transferência dos ensaios para a avaliação de risco para sistema *in vitro*. Diferentes abordagens foram desenvolvidas para suprir essa necessidade como, por exemplo, a geração de equivalentes de epiderme, que foi considerada a mais promissora e extensamente investigada. Dois modelos de equivalentes de epiderme (EpiDerm™-MATTEK e EPISKIN™ L'ORÉAL) comercialmente disponíveis foram validados pelo ECVAM (Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos) e outros modelos de epiderme reconstruída estão sendo desenvolvidos em diferentes laboratórios de pesquisa do mundo. Esses dois modelos são recomendados no Guia 431 (Organização para cooperação e desenvolvimento econômico - OECD) que avalia *in vitro* a corrosão da pele. No Brasil esta prática ainda é inexistente, porém deverá ser implementada rapidamente para que atenda aos conceitos humanitários internacionais. Sendo assim, este projeto teve como objetivo criar, dentro dos princípios do Guia 431, um equivalente de epiderme e posterior otimização deste processo através da incorporação de uma membrana biopolimérica (PET e colágeno I) como suporte celular. O modelo de epiderme humana reconstruída consiste de um tecido epidérmico diferenciado tridimensionalmente a partir de queratinócitos humanos normais cultivados em um meio quimicamente definido na interface ar-líquido. A validação deste modelo para ensaios de avaliação do potencial corrosivo de substâncias foi realizada seguindo os princípios do Guia 431 da OECD, sendo que quatro substâncias da lista indicada pelo Guia foram testadas: duas corrosivas (Ácido Lático e Ácido Octanóico) e duas não corrosivas (2-bromo Etilbenzeno e Benzilacetona), assim como controles positivo (Ácido acético) e negativo (NaCl 0,9%). Os resultados de viabilidade celular após 3 minutos e 1 hora de exposição às substâncias teste demonstraram que o nosso modelo permite distinguir as substâncias entre corrosivas e não corrosivas, no entanto não permite a subcategorização das corrosivas em 1A ou 1B/C. Assim, nós demonstramos o potencial do nosso modelo como um método de teste relevante e confiável que pode ser usado para pesquisa e investigação de risco químico. Visando a otimização do modelo, testamos a incorporação de uma membrana biopolimérica eletrofiada de PET e colágeno tipo I como suporte para crescimento celular em substituição ao *transwell*. A análise histológica das membranas demonstrou que as mesmas são biocompatíveis, permitindo adequada adesão e proliferação dos queratinócitos e dos fibroblastos, no entanto, não se observou uma diferenciação adequada com a formação de uma epiderme semelhante à humana (estratos basal, espinhoso, granuloso e córneo). Além disso, a falta de uniformidade e reprodutibilidade nos resultados indicam que é necessário uma otimização dos processos de fabricação das membranas e geração do equivalente epidérmico. Em perspectiva, este equivalente epidérmico poderá ser utilizado para pesquisa e avaliação de risco de fármacos, medicamentos, cosméticos, praguicidas, etc., contribuindo para a geração de métodos alternativos aos testes em animais e inserindo o Brasil na tendência internacional do desenvolvimento de testes para avaliação do risco.

Palavras chave: equivalente epidérmico, avaliação de risco, biopolímeros.

ABSTRACT

Catarino, C. M. **Development of an epidermal equivalent model on a *transwell* and on a biopolymer scaffold.** 2014. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

Currently there is a strong global trend towards the development of *in vitro* tests that fulfill the use of animals in safety evaluation tests. In 1986, the European Directive 86/609/EEC led to the discussion of global reduction of animal testing and the 7th amendment of this Policy, published in 2004, ordered the transfer of the tests for risk assessment for *in vitro* system. Different approaches have been taking into account to achieve this goal, for example, the development of epidermal equivalents models, which have been considered the most promising and widely studied model. ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) has validated two models of reconstructed epidermis (EpiDerm™ - Mattek and EPISKIN™ - L'Oréal) that are commercially available and other models are being developed in different research laboratories in the world. These two models are recommended in Guide 431 (Organisation for Economic Cooperation and Development - OECD) for *in vitro* evaluation of skin corrosion. In Brazil, this practice is still lacking, but should be implemented quickly so that meets international humanitarian concepts. Therefore, this project aimed the creation, within the principles of Guide 431, of an epidermal equivalent and the optimization of this process through the incorporation of a biopolymer membrane (PET and collagen I) as cellular support. The reconstructed human epidermis (RHE) consists of a differentiated three-dimensional epidermal tissue reconstructed from normal human keratinocytes in a chemically defined medium and air liquid interface growth. The validation of this model for the assessment of skin corrosion potential of substances was performed following the principles of the OECD Guide 431, hereupon four substances from the list indicated by the Guide were tested: two corrosive (lactic acid and octanoic acid) and two non-corrosive (2-phenylethyl bromide and benzylacetone) and positive (acetic acid) and negative (NaCl 0.9%) controls. The cell viability results after 3 minutes and 1 hour of exposure to the test substances indicates that our model is capable of distinguishing the substances among corrosive and non-corrosive. Although they do not, allow the sub-categorization of corrosive in 1A or 1B/C. Thus, we have demonstrated that our model is a potentially relevant and a reliable test method that could be used in research and specifically for the investigation of chemical hazard. To optimize the model, we tested the incorporation of a biopolymer membrane composed of PET and type I collagen as support for cell growth, as a replacement of the transwell. Histological examination of membranes has shown that they are biocompatible, enabling adequate adhesion and proliferation of keratinocytes and fibroblasts. However, there was no adequate differentiation with the formation of a similar human epidermis (stratum basale, spinosum, granulosum and corneum). Moreover, the lack of uniformity and reproducibility of the results indicates that it is still necessary to optimize the membranes production process and the generation of the epidermal equivalent using the membranes as support. In perspective, the developed epidermal equivalent may be used for research and risk assessment of pharmaceuticals, medicines, cosmetics, chemicals, pesticides, among others. This directly contributes to the development of alternative methods able to substitute animal testing in Brazil and follows the international trend of development tests for risk assessment.

Keywords: epidermal equivalent, risk assessment, biopolymers.

LISTA DE SIGLAS

C:	Corrosiva (substância)
CASRN:	<i>Chemical Abstracts Service Registry Number</i>
D10:	DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino.
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EE:	Equivalente Epidérmico
ECVAM:	Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos - <i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EDTA:	ácido etileno diamino tetra-acético
EGF:	<i>epidermal growth factor</i>
FDA:	<i>US Food and Drug Administration</i>
GHS:	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
HFIP:	Álcool hexafluoroisopropanol
HUVEC:	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
L:	Líquido
MEC:	Matriz extracelular
MEV:	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT:	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NC:	Não corrosiva (substância)
NMF	<i>Natural moisturizing factor</i>
OECD:	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico - <i>Organisation de Coopération et de Développement Économiques</i>
ONU:	Organização das Nações Unidas
PBS:	tampão fosfato salino contendo 1mM EDTA, na ausência de cálcio e magnésio
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET:	Politereftalato de Etila
RHE:	<i>Reconstructed Human Epidermis</i> – Epiderme humana reconstruída.
S:	Sólido
S8,2:	Malha eletrofiada PET/colágeno 80:20 (m/m) em álcool

hexafluoroisopropanol

S4,6: Malha eletrofiada PET/colágeno 40:60 (m/m) em álcool
hexafluoroisopropanol

TGF- α : *transforming growth factor α*

TEWL *Transepidermal water loss*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A. Foto da pele humana. B. Fotomicrografia da pele humana.	21
Figura 2: Estrutura da epiderme humana.	22
Figura 3: Características histológicas do estrato córneo da pele do pênis (A) com 6 ± 2 (n=9) camadas de corneócitos e das costas (B) com 13 ± 3 (n=18) camadas de corneócitos.	23
Figura 4: A. Representação esquemática da estrutura e dos componentes funcionais dos queratinócitos ao se diferenciarem do estrato granuloso para o estrato córneo e B. Representação do padrão "Bricks and mortar" da pele.	24
Figura 5: Linha do tempo do desenvolvimento de métodos alternativos voltados à pele (1960-2000).	27
Figura 6: Linha do tempo do desenvolvimento de métodos alternativos voltados à pele (2000-2015).	28
Figura 7: Esquema representativo da técnica de eletrofiação.	38
Figura 8: Estrutura química do PET.	39
Figura 9: Isolamento das células da pele à partir de amostra de pele de prepúcio.	44
Figura 10: Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para detecção de HPV por PCR em gel de agarose 1,5%.	46
Figura 11: Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para sete microrganismos usando PCR multiplex em gel de poliacrilamida 8%.	47
Figura 12: Esquema da geração do equivalente epidérmico.	48
Figura 13: Otimização do protocolo de geração do equivalente epidérmico.	49
Figura 14: Esquema de geração de pele artificial.	51
Figura 15: Esquema para realização do ensaio de corrosão (OECD, 2013).	54

Figura 16: Gráfico da curva de crescimento do queratinócito KP#87 em passagens nº 2, 4 e 6.....	59
Figura 17: Fotomicrografia da epiderme humana e dos modelos de epiderme <i>in vitro</i> SkinEthic, EpiSkin e Epiderm Tissue Model.....	60
Figura 18: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana <i>transwell</i> quanto ao número de células e recobrimento por colágeno I e IV.	61
Figura 19: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana <i>transwell</i> quanto ao número de células, recobrimento por colágeno I e IV e adição de CaCl ₂ ao meio.	63
Figura 20: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana <i>transwell</i> quanto ao recobrimento por colágeno I e IV e tempo de cultura submersa.	64
Figura 21: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana <i>transwell</i> quanto ao tamanho do <i>transwell</i> e recobrimento por colágeno I e IV.	65
Figura 22: Representação dos fatores solúveis liberados pelos fibroblastos que afetam a proliferação e diferenciação de queratinócitos.	67
Figura 23: Fotomicrografia do equivalente epidérmico desenvolvido no laboratório de Citopatologia Clínica da Universidade de São Paulo.	69
Figura 24: Gráfico da viabilidade celular dos equivalentes de epiderme após ensaio de corrosão.	73
Figura 25: Fotomicrografia de equivalente epidérmico após ensaio de corrosão (Guia 431- OECD).....	76

Figura 26: Fotomicrografia de equivalente de pele após ensaio de corrosão (baseado no Guia 431- OECD).....	81
Figura 27: Efeito do tratamento de esterilização da membrana eletrofiada de PET..	83
Figura 28: Efeito do tratamento de esterilização da membrana eletrofiada de PET/colágeno 80:20.....	84
Figura 29: Efeito do tratamento de esterilização da membrana eletrofiada de PET/colágeno 40:60.....	86
Figura 30: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana biopolimérica.	87
Figura 31: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana biopolimérica.	89
Figura 32: Fotomicrografia de equivalente epidérmico gerado sobre membrana biopolimérica de PET e colágeno tipo I (80:20).....	93
Figura 33: Fotomicrografia de equivalente epidérmico após primeiros ensaios de corrosão segundo Guia 431 OECD.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores relacionados à otimização de modelos de pele <i>in vitro</i>	34
Tabela 2: Lista de pacientes doadores de pele para isolamento de células.	44
Tabela 3: Tabela de condições testadas para otimização do protocolo de geração de epiderme equivalente.	50
Tabela 4: Substâncias utilizadas para teste de corrosão (Guia 431 da OECD).	53
Tabela 5: Tabela de condições testadas para padronização de equivalente de epiderme e pele sobre membrana biopolimérica.....	56
Tabela 6: Lista dos anticorpos primários utilizados nas imunomarcações.	58
Tabela 7: Viabilidade do equivalente epidérmico após ensaio de corrosão (Guia 431 OECD) e classificação prevista pela UN GHS/ EU CLP.	72
Tabela 8: Tabela de classificação das substâncias segundo Guia do OECD 431 com base nos modelos de equivalente epidérmico EpiDerm TM SCT e SkinEthic TM RHE. (OECD, 2013).....	74
Tabela 9: Viabilidade para o equivalente de pele e de epiderme após ensaio de corrosão (1 hora).....	79
Tabela 10: Viabilidade para o equivalente epidérmico e classificação prevista pela UN GHS/ EU CLP.	106
Tabela 11: IC ₅₀ de substância teste e SDS para queratinócitos 79, 87 e 88.	110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Pele Humana	21
1.2	Avaliação de risco	25
1.3	Modelos <i>in vitro</i> para avaliação do risco de substâncias em pele	29
1.3.1	Biópsia de Pele	30
1.3.2	Culturas em monocamada	30
1.3.3	Modelos tridimensionais	31
1.3.3.1	Pele humana reconstruída ou <i>full thickness</i>	31
1.3.3.2	Equivalentes Epidérmicos	31
1.4	Otimização de modelos tridimensionais <i>in vitro</i>	33
1.5	Suportes poliméricos para geração de modelos <i>in vitro</i>	35
1.5.1	Membranas biopoliméricas eletrofiadas	38
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Isolamento de células	42
3.1.1	Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares	45
3.1.2	Controle de qualidade das culturas primárias	45
3.2	Determinação da curva de crescimento de queratinócitos	47
3.3	Geração e Preparo de Equivalente de Epiderme	48
3.3.1	Adequação de protocolo	48
3.4	Geração e preparo de Pele Artificial	50
3.5	Testes de corrosão – OECD GUIA 431	52
3.5.1	Avaliação da toxicidade sobre Equivalente de Epiderme e Pele Reconstruída	53
3.6	Geração das membranas biopoliméricas	54
3.6.1	Esterilização das membranas biopoliméricas	55
3.6.2	Geração de Equivalente de Epiderme e Pele sobre membrana biopolimérica	55

3.7	Controle da Qualidade Histológica dos Equivalentes de Epiderme e Pele Artificial	57
3.8	Análise imunohistoquímica dos Equivalentes de Epiderme	57
3.9	Análise Estatística dos dados	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Curva de crescimento de queratinócitos	59
4.2	Padronização do equivalente epidérmico	60
4.3	Pré-validação do equivalente epidérmico: teste de corrosão (Guia 431 OECD)	71
4.4	Teste de corrosão do equivalente de pele humana reconstruída “ <i>full thickness</i> ”	79
4.5	Efeito do processo de esterilização nas membranas biopoliméricas	82
4.6	Equivalente epidérmico sobre membrana biopolimérica	86
5	CONCLUSÕES	94
5.1	Considerações Finais	95
6	PRODUÇÃO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA	96
6.1	Apresentação da Produção Referente ao Projeto de Pesquisa em Congressos	96
6.2	Colaborações em Projetos de Pesquisa	96
7	REFERÊNCIAS	97
8	APÊNDICES	106
8.1	Apêndice A - Ensaio de corrosão preliminar (Guia 431 OECD)	106
8.2	Apêndice B - Colaboração Interlaboratorial INMETRO	109
9	ANEXO	111
9.1	Informações para os Membros da Banca Julgadora de Mestrado	111
9.2	Comitê de ética	112
9.3	Curriculo Lattes	113
9.4	Ficha do Aluno	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pele Humana

A pele humana é o órgão primordial de defesa, que protege os tecidos subjacentes, além de ser responsável pela regulação da temperatura, agir como reserva de nutrientes e ainda conter terminações nervosas sensitivas. Age também no balanço hídrico evitando a perda transepidermal (TEWL) excessiva de água para o ambiente. Ela é composta por três compartimentos principais: a hipoderme, a derme e a epiderme (figura 1). A derme localiza-se acima da hipoderme, que é uma camada de tecido conjuntivo frouxo, e é constituída por uma matriz extracelular rica em colágeno tipo I, elastina e glicosaminoglicanos, na qual fibroblastos e células endoteliais estão imersas, além de glândulas e folículos pilosos. Já a epiderme é camada mais externa da pele, que fica em contato direto com o meio ambiente, é composta majoritariamente por queratinócitos, além de melanócitos e células de Langerhans (Pereira *et al.*, 2013).

Figura 1: A. Foto da pele humana. B. Fotomicrografia da pele humana.

Fonte: A. Hjs Consulting, 2015. B. Adaptado de EpiSkin, 2015.

Os queratinócitos estão distribuídos no epitélio em quatro estratos principais: estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo (figura 2), formados ao longo da proliferação e maturação deste tipo celular. Ao migrar das camadas mais basais para as camadas mais externas os queratinócitos sofrem um processo de diferenciação celular no qual alterações morfológicas e bioquímicas levam à célula de um estado proliferativo e indiferenciado (camada basal) a uma condição de perda quase total da atividade metabólica, gerando uma camada de células mortas anucleadas, com citoplasma achatado (Fuchs, 1990). Neste percurso, há a

regulação negativa de um serie de proteínas basais e um aumento na expressão de marcadores suprabasais (estrato espinhoso e granuloso) (Watt, 1983; Fuchs, 1990; Lamb e Ambler, 2013).

Figura 2: Estrutura da epiderme humana.

Fonte: Adaptado de Silver Botanicals, 2014.

Os queratinócitos do estrato basal apresentam forma cubóide e são os únicos a realizarem mitose e síntese de DNA na epiderme (Watt, 1983; Fuchs, 1990). Estas células possuem um citoesqueleto repleto e disperso de filamentos de queratina, em especial as queratinas 5 e 14 (Fuchs, 1990).

Os estratos suprabasais seguintes (4 a 8 camadas de células) perdem a capacidade de realizar mitose, no entanto ainda mantêm a atividade metabólica, principalmente para a síntese de algumas proteínas como, por exemplo, as queratinas 1 e 10. No estrato espinhoso são produzidas importantes proteínas que irão constituir o envelope proteico, a exemplo a involucrina (depositada na parte interna da membrana citoplasmática). Ao passar do estrato espinhoso para o granuloso, os queratinócitos já maduros passam a sintetizar proteínas finais como a filagrina e a loricrina. É neste estrato também que ocorre o acúmulo de grânulos de querato-hialina, proteína que auxilia na agregação de queratina em filamentos paralelos (Poumay e Coquette, 2007).

O estrato mais externo da epiderme, o estrato córneo, é formado por células altamente diferenciadas anucleadas conhecidas como corneócitos. A espessura

deste estrato depende do número de camadas de células que se acumulam na superfície da epiderme e varia de acordo com a região anatômica. Por exemplo, enquanto as genitálias e a pele do rosto apresentam entre 6 ± 2 ($n=9$) e 9 ± 2 ($n=84$) camadas de células, respectivamente, o escalpo possui 12 ± 2 ($n=12$) e a sola das mãos e pés 47 ± 24 ($n=42$) camadas de corneócitos, com destaque ao calcanhar que chega a acumular 86 ± 36 ($n=5$) camadas de células (figura 3) (Ya-Xian, Suetake e Tagami, 1999). A espessura deste estrato está relacionado à proteção tanto contra a ação de agentes externos quanto a perda de água, quanto mais espessa à pele maior a proteção.

Figura 3: Características histológicas do estrato córneo da pele do pênis (A) com 6 ± 2 ($n=9$) camadas de corneócitos e das costas (B) com 13 ± 3 ($n=18$) camadas de corneócitos.

Fonte: Adaptado de Ya-Xian, Suetake e Tagami (Ya-Xian, Suetake e Tagami, 1999).

Os corneócitos apresentam formato achatado e estão organizados em camadas sobrepostas envoltas por uma matriz lipídica de forma semelhante a uma paredes com tijolos (células) e cimento (matriz de lipídeos) em um padrão conhecido como “*bricks and mortar*” (figura 4 B) (Watt, 1983; Fuchs, 1990; Poumay e Coquette, 2007). Elas possuem citoesqueleto rico em filamentos de queratina e (Watt, 1983; Fuchs, 1990; Poumay e Coquette, 2007) são unidos por corneodesmossomos (figura 4 A).

Os corneócitos estão envoltos por uma matriz lipídica composta principalmente de ceramidas (cerca de 50% w/w), ácidos graxos (10-20% w/w), colesterol (25% w/w) entre outros lipídeos (menos de 5% de) (Law *et al.*, 1995; Madison, 2003). Esta matriz lipídica, juntamente com os fatores de hidratação natural da pele (NMF = *natural moisturizing factor*), garante a função barreira para retenção de água no organismo. NMF é formado por uma mistura de amido ácidos e

seus derivados, ácido láctico, açúcar entre outras moléculas higroscópicas que agem como umectantes endógenos (Madison, 2003).

Figura 4: A. Representação esquemática da estrutura e dos componentes funcionais dos queratinócitos ao se diferenciarem do estrato granuloso para o estrato córneo e B. Representação do padrão "Bricks and mortar" da pele.

CDSN: corneodesmosina; DSG1: desmogleina 1; DSC1: desmocollina 1; TJ: junções de oclusão.

Fonte: A. Adaptado de Ishida-Yamamoto e Igawa, 2014 e B. Adaptado de STW World Press, 2015.

Alguns defeitos genéticos relacionados ao metabolismo de lipídeos e proteínas do estrato córneo levam a perda da função barreira da epiderme e estão relacionados a algumas doenças da pele, entre elas psoríases e dermatite atópica (Madison, 2003). Já foi relatado, por exemplo, que pacientes com dermatite atópica apresentam alguma forma de mutação do gene responsável pela expressão de filagrina, demonstrando o papel fundamental desta proteína para manutenção da função barreira e manutenção de uma pele saudável (Pendaries *et al.*, 2015). Na doença de Gaucher a enzima β -glucocerebrosidase, responsável por converter glicosilceramidas em ceramidas na matriz lipídica do estrato córneo, apresenta-se defeituosa, o que leva à anormalidades na função barreira, ocasionando até mesmo morte em recém nascidos nos casos mais severos (Sidransky, Sherer e Ginns, 1992).

Além de manter a epiderme hidratada e flexível, a presença de água juntamente com o pH ácido do estrato córneo (4,5-5,5) são importantes para uma série de reações químicas e enzimáticas, entre elas a clivagem das ligações célula-

célula que permite a descamação dos corneócitos e o processamento lipídico (Ohman, 1994, apud Sun, 2015).

A atividade metabólica reduzida destas células no estrato córneo ainda é suficiente para que os corneócitos ajam como biosensores enviando sinais às camadas inferiores da epiderme para que esta possa responder ao estresse externo (Harding, 2004).

1.2 Avaliação de risco

Avaliação do risco é o processo de monitoramento de substâncias químicas que visa a obtenção de informação sobre toxicidade (perigo) e exposição no sentido de minimizar ou prevenir a ocorrência de efeitos adversos à saúde humana (Basketter, Darlenski e Fluhr, 2008). Para a avaliação do perigo, são recomendados testes toxicológicos padronizados de acordo com a via de exposição de um dado composto em estudo. A via cutânea constitui-se uma importante via de exposição a agentes físicos e substâncias químicas como cosméticos, medicamentos e praguicidas. A causa pode ser intencional, como o uso de cosméticos, ou acidental, como ocorre nas exposições ocupacionais.

Os primeiros testes desenvolvidos para avaliação de toxicidade cutânea usavam animais como principal modelo experimental. Esforços relacionados à redução do uso destes animais em testes de avaliação do risco vêm ganhando força em todo mundo há algumas décadas devido à pressão exercida por grupos de proteção aos animais, opinião pública e debates éticos (figura 5 e 6). Em 1986, uma diretiva da União Européia relacionada com a proteção do uso de animais em experimentos científicos (Diretiva 86/609/EEC) (European Union, 1986) banuiu os testes em animais quando uma alternativa cientificamente comprovada existisse. A “7th Amendment to the Cosmetics Directive” (Directive 76/768/EEC) (Rossignol, 2005) determinou, a partir de 2013, a proibição completa de testes em animais que investigarem efeitos de ativos cosméticos. No Brasil, foi aprovada no estado de São Paulo em 24 de Janeiro de 2014 a Lei N°15.316 que proíbe a utilização de animais em testes de laboratórios para substâncias químicas, cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes. O texto apresenta apenas uma exceção para a qual os

animais ainda poderão ser usados por até cinco anos no caso de novas substâncias sobre as quais não exista nenhum conhecimento prévio (São Paulo, 2014).

Ao contrário das diretrizes acima mencionadas, o “REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)” (European Regulation, 2006) que foi implementado em 2013, demandaria de um aumento no número de experimentos em animais, uma vez que tem como objetivo reavaliar o risco de quase trinta mil substâncias já disponíveis no mercado europeu (Zuang e Hartung, 2005). Estes fatos resultam em um grande estímulo para o desenvolvimento de novas técnicas *in vitro* para a substituição de testes em animais.

Alguns pontos importantes devem ser considerados no desenvolvimento de modelos *in vitro* para estudos de avaliação do risco. Para que um modelo *in vitro* possa substituir um teste em animal, ele deve ser capaz de gerar dados comparáveis aos dos modelos *in vivo* disponíveis. Além disso, o aspecto mais importante a ser considerado no desenvolvimento de um modelo *in vitro* é o de gerar resultados que possam ser correlacionados com dados em humanos. Discute-se frequentemente que um único teste *in vitro* não seria suficiente para suprir a necessidade de testes em animais. Acredita-se que uma bateria de testes deva ser desenvolvida e utilizada em conjunto visando gerar resultados mais robustos em relação ao perfil toxicológico de uma substância. Se o modelo *in vitro* desenvolvido tiver fins regulatórios, este precisa ser previamente validado. Sua relevância e confiabilidade devem ser estabelecidas segundo procedimentos internacionalmente reconhecidos e comparados com dados obtidos através de testes em humanos (OECD, 2005). Se um modelo *in vitro* é desenvolvido para fins industriais este deve ser planejado e desenvolvido visando avaliar compostos em larga escala. Em resumo, o desenvolvimento de um novo teste *in vitro* deve levar em conta em que âmbito (pesquisa, indústria, regulamentação) ele será utilizado. Ou seja, a abordagem do desenvolvimento do teste está diretamente relacionada com seus fins.

Figura 5: Linha do tempo do desenvolvimento de métodos alternativos voltados à pele (1960-2000).

Figura 6: Linha do tempo do desenvolvimento de métodos alternativos voltados à pele (2000-2015).

1.3 Modelos *in vitro* para avaliação do risco de substâncias em pele

Em 1959, Russel e Burch apresentaram ao mundo um questionamento sobre o uso de animais em laboratório (Balls, 2010). Desde então cientistas do mundo todo vem dedicando incansáveis esforços para desenvolver modelos *in vitro* que sejam capazes de substituir a utilização animal, e dentre esses métodos, grandes esforços tem sido feitos no desenvolvimento de modelos que mimetizem a pele humana (figura 5 e 6).

Os primeiros esforços neste sentido foram feitos com o desenvolvimento de culturas celulares, a exemplo, os métodos desenvolvidos para cultura e expansão de queratinócitos estabelecidos nos anos 70 por James Rheinwald e Howard Green. Seus experimentos consistiam na cocultura de queratinócitos humanos e fibroblastos de camundongo irradiados em um meio suplementado com soro e fatores de crescimento (Rheinwald e Green, 1975). Em 1979, pela primeira vez cientistas perceberam que expor as células epiteliais a uma interface ar-líquido melhorava significativamente a diferenciação dos queratinócitos (Pruniéras, Régnier & Schlotterer, 1979, apud, Asselineau *et al.*, 1986).

O uso de modelos *in vitro* permite reduzir o número de animais usados em testes de avaliação cutânea e também a redução no número de voluntários para os testes em fases mais avançadas. Além disso, esses modelos são reprodutíveis e apresentam baixa variabilidade entre os ensaios, se comparado à variabilidade animal ou ao uso de modelos “*ex vivo*” como por exemplo de amostras de pele provenientes de cirurgia. Esses modelos também permitem a separação das diferentes células para serem avaliadas individualmente (Poumay e Coquette, 2007).

Cada modelo é desenvolvido com um objetivo específico, e muitas vezes apresentam vantagens para um determinado tipo de estudo, mas para outro tipo de estudo apresentam limitações (Poumay e Coquette, 2007).

Atualmente existem quatro categorias de modelos usados em avaliação de toxicidade e eficácia de substâncias em pele: modelos *ex vivo*: biópsias de pele obtidas de cirurgias e modelos *in vivo*: modelos de cultura celular em monocamadas e modelos tridimensionais, compreendendo os equivalentes de pele completa e os modelos de equivalente de epiderme.

1.3.1 Biópsia de Pele

Biópsias de pele provenientes de cirurgias plásticas são cultivadas *in vitro* e compõem o modelo mais avançado em relação à função de barreira da pele já que possuem propriedades equivalentes à pele humana *in vivo* (Gibbs *et al.*, 2002).

Além da função barreira, fator relevante para avaliação da eficácia e segurança, este modelo apresenta como vantagem a presença de mais tipos celulares em relação aos equivalentes de pele (ex. células de Langerhans, endoteliais e melanócitos), sendo, portanto, um excelente modelo para pesquisa (Berard, Marty e Nicolas, 2003).

No entanto, um número limitado de biópsias de pele está disponível no mercado (PREDISKIN®). Além disso, o uso de biópsias de pele pode trazer algumas limitações quanto à sua aplicabilidade, como a reprodutibilidade de resultados e a disponibilidade (necessidade de um constante suprimento de pele de doadores e de condições de transporte adequadas), acarretando dessa forma em problemas éticos e de logística (Zuang *et al.*, 2002).

1.3.2 Culturas em monocamada

As culturas em monocamada são baseadas em um único tipo celular ou mais (cocultura) e para tanto utilizam células primárias ou linhagens celulares pré-estabelecidas (Corsini *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Brohem *et al.*, 2011).

Os testes *in vitro* baseados em modelos de culturas de células em monocamadas trazem grande quantidade de resultados e são relativamente simples de serem executados, o que é interessante para a indústria uma vez que permite avaliar a toxicidade ou eficácia de um painel extenso de substâncias. Para fins de pesquisa, testes em monocamadas são valiosos para investigar os efeitos de uma determinada substância sobre um determinado tipo celular. A principal desvantagem deste tipo de cultura para células da pele é a ausência do estrato córneo, de modo que esse modelo não permite determinar se um composto tem a capacidade de penetrar na pele e atuar nas camadas inferiores.

1.3.3 Modelos tridimensionais

Os modelos tridimensionais de reconstrução de pele e epiderme foram desenvolvidos visando suprir a ausência do estrato córneo nas culturas em monocamada. Os primeiros modelos desenvolvidos foram os equivalentes de pele, nos quais uma epiderme equivalente é gerada sobre um suporte dérmico. Visando simplificar o modelo e reduzir custos um modelo de epiderme equivalente foi desenvolvido na ausência de um suporte dérmico.

1.3.3.1 Pele humana reconstruída ou *full thickness*

Equivalentes de pele (*full thickness* ou pele reconstruída) são formados por um compartimento epidérmico e um dérmico, portanto mais semelhantes à situação *in vivo* (Bell *et al.*, 1983; Brohem *et al.*, 2011). Esses modelos são menos utilizados para a avaliação do risco do que os equivalentes de epiderme apesar de estarem disponíveis no mercado (TestSkin®, Apligraf®, AST-2000®, Skin2®). Além disso, nenhum desses equivalentes de pele foi validado pelo ECVAM (Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos) e discute-se o fato de que a presença da derme não acrescentaria nenhum tipo de benefício à avaliação do risco. Este fato ainda é questionável, pois, a presença tanto da epiderme quanto da derme tornaria o modelo fisiologicamente mais relevante uma vez que permitem a investigação de interação célula-célula e célula-matriz extracelular recriando o microambiente tecidual (Spiekstra *et al.*, 2005; Brohem *et al.*, 2011). Essas interações podem modificar sensivelmente a ação tóxica ou farmacológica das substâncias químicas. Este modelo permite também detectar a difusão de uma substância qualquer nesse compartimento e avaliar o efeito sobre fibroblastos e matriz de colágeno.

1.3.3.2 Equivalentes Epidérmicos

Em busca de modelos de confecção mais simples que a pele reconstruída e visando a redução de custos, buscou-se desenvolver modelos *in vitro* de epiderme, nos quais os queratinócitos se desenvolvem sobre um substrato inerte, como filtros, revestido ou não com proteínas de membrana basal (Poumay e Coquette, 2007).

Esse modelo apresenta uma epiderme completamente diferenciada que mimetiza a epiderme humana e são reconstruídos a partir de queratinócitos humanos primários obtidos de biopsias de pele humana.

Até o momento, nenhuma linhagem celular estabelecida de queratinócitos mostrou-se capaz de formar uma epiderme completamente diferenciada (estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo) (Ponec *et al.*, 2002). No entanto, estudos realizados em nosso laboratório, vêm demonstrando que as células HaCat (linhagem de queratinócitos humanos imortalizado) também têm potencial de se diferenciarem quando na presença de fatores de crescimento adequados (Zanoni, 2012).

O estrato córneo formado nos equivalentes de epiderme faz com que estes possuam funções de barreira similares à epiderme humana, tornando estes modelos valiosas ferramentas em estudos de avaliação de toxicidade cutânea. Atualmente, alguns equivalentes de epiderme estão disponíveis comercialmente (SkinEthic™RHE, EpiDerm™SCT, EpiSkin™, epiCS®prediction model), porém apenas EpiDerm™ Skin Corrosivity Test e EpiSkin™ Standard Model foram formalmente validados pelo ECVAM para avaliação de potencial corrosivo de substâncias (OECD, 2014). Os fabricantes destes modelos de equivalente epidérmico controlam cada lote em relação a viabilidade, função barreira, histologia e segurança (contaminação viral (HIV I e II, hepatite B e C), bactérias e fungos). (Portes *et al.*, 2002; Molinari *et al.*, 2013).

O Guia 431 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD) permite a identificação de substâncias ou misturas corrosivas ou não corrosivas usando estes modelos e amparando-se na determinação do peso de evidências empregando outras informações disponíveis como pH, relação estrutura-atividade ou dados humanos ou em animais. A corrosão da pele refere-se à produção de danos irreversíveis da mesma que se manifesta como necrose visível através da epiderme e na derme, após a aplicação de um material de teste [como definido pela Organização das Nações Unidas (ONU) Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS)] (OECD, 2013). Os mecanismos principais de corrosão da pele são destruição através da erosão e solubilização do estrato córneo ou rápida penetração de substâncias altamente tóxicas sem precisar destruir a barreira da pele (Ceetox, 2009).

Em 2013, uma atualização do Guia 431 passou a apresentar a subcategorização das substâncias corrosivas em classes 1A, 1B e 1C, respectivamente da mais corrosiva para a menos corrosiva. As informações do Guia 431 também demonstram se um novo modelo de epiderme equivalente desenvolvido é capaz de gerar dados comparáveis aos dados em humanos e nos demais modelos validados podendo assim ser usado em testes de avaliação de toxicidade.

Os modelos de epiderme equivalente validados pelo ECVAM são produzidos na Europa, Estados Unidos e Ásia, sendo assim de difícil acesso no Brasil por questões logísticas e, sobretudo, alfandegárias. A recente pressão da sociedade brasileira pela substituição dos testes em animais e a dificuldades de acesso aos modelos validados torna fundamental o desenvolvimento de um modelo nacional, que possa ser disponibilizado às indústrias e laboratórios do Brasil. Além disso, é importante permitir a independência das empresas de um único modelo, ou seja, é interessante que existam mais de um modelo, de fontes diferentes, que respondam aos testes da mesma forma. Se um modelo *in vitro* deixar de ser comercializado, temporariamente ou permanentemente, a empresa não seria forçada à adaptar rapidamente seus testes à um novo modelo (Poumay e Coquette, 2007).

A avaliação de um novo modelo deve seguir passos rigorosos no que tange a caracterização morfofuncional, segundo critérios imunohistoquímicos e imunológicos das culturas primárias de queratinócitos a fim de reproduzir as condições da epiderme humana. Além disto, a padronização de um kit frente a sua aplicação para avaliação de segurança de substâncias químicas deve seguir guias internacionais com o uso de substâncias de referência para a validação do modelo, como por exemplo, o Guia 431 da OECD (2013).

1.4 Otimização de modelos tridimensionais *in vitro*

O processo de proliferação, diferenciação e morte celular é governado de forma geral por uma série de fatores de crescimento celular e citocinas que são produzidos ou processados por uma variedade de células. A matriz extracelular pode se ligar e liberar estes fatores e citocinas de forma a protegê-los da degradação. Além destes fatores, condições de cultura, como temperatura, tempo e umidade também podem influenciar a geração de modelos de pele *in vitro*. A tabela

1 lista uma série destes fatores e suas funções na proliferação e diferenciação celular que já foram testados com o objetivo de melhorar o desenvolvimento de modelos de pele.

Tabela 1: Fatores relacionados à otimização de modelos de pele *in vitro*.

Substância	Função	Fonte
IGF-1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>)	Estimula protrusão da membrana basal e facilita espalhamento celular.	(Peplow e Chatterjee, 2013)
EGF (<i>epidermal growth factor</i>)	Induz contração de queratinócitos e estimula migração celular ao invés da proliferação.	(Hasskarl, Velupillai e Munger, 2006; Peplow e Chatterjee, 2013)
TGF-α (<i>transforming growth factor α</i>)	Aumenta migração de queratinócitos mantém cessada a proliferação das células diferenciadas.	(Fuchs, 1990; Peplow e Chatterjee, 2013)
HGF (<i>hepatocyte growth factor</i>)	Estimula migração e melhora cicatrização.	(Peplow e Chatterjee, 2013)
VEGF	Estimula migração de queratinócitos.	(Peplow e Chatterjee, 2013)
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Favorece a secreção e organização da matriz extracelular lipídica no estrato córneo e melhora a função barreira da epiderme.	(Pasonen-Seppanen <i>et al.</i> , 2001; Auxenfans <i>et al.</i> , 2009)
Cálcio	Importante para formação de desmossomos e junções celulares, inibi a proliferação de queratinócitos e induz estratificação epitelial.	(Koizumi <i>et al.</i> , 1991; Sivamani, Lam e Isseroff, 2007; Itoh <i>et al.</i> , 2011; Lamb e Ambler, 2013)
Soro fetal bovino	Estimula estratificação e diferenciação celular;	(Lamb e Ambler, 2013)
Filme de colágeno	Melhora a adesão celular pelo promoção de hemidesmossomos e laminina basal, inibe o crescimento de fibroblastos, melhora a organização tecidual e aumenta a homogeneidade de diferenciação dentro de uma cultura.	(Holbrook e Henings, 1983)
Toxina colérica	Indutor de cAMP (sinalizador celular).	(Poumay e Coquette, 2007; Takagi <i>et al.</i> , 2011)
Isoproterenol	Indutor de cAMP (sinalizador celular).	(Takagi <i>et al.</i> , 2011)

Transferina	Proteína carreadora de ferro associada ao crescimento de queratinócitos.	(Keenan, Pearson e Clynes, 2006; Takagi <i>et al.</i> , 2011)
Meio condicionado de fibroblasto	Fatores solúveis secretados por fibroblastos em meio de cultura são suficiente para a indução de proliferação e diferenciação de queratinócitos.	(El Ghalbzouri e Ponec, 2004; Wong, Mcgrath e Navsaria, 2007)
Hidrocortisona	Promove proliferação de queratinócitos.	(Takagi <i>et al.</i> , 2011)
Insulina	Envolvida no metabolismo de glucose e lipídeos, absorção de aminoácidos, síntese de DNA, regula a expressão do receptor de EGF.	(Keenan, Pearson e Clynes, 2006; Bae, Park e Kim, 2014)
Interface ar-líquido	Promove a síntese de profilagrina e o aparecimento do fenótipo granular com o desenvolvimento de grânulos de queratohialina – característica da diferenciação dos queratinócitos.	(Prunieras, Regnier e Woodley, 1983)
Redução de umidade	Induz a formação de um estrato córneo mais coeso e uniforme e a presença de gradiente de íons normal.	(Mak <i>et al.</i> , 1991; Nolte <i>et al.</i> , 1993; Sun <i>et al.</i> , 2015)

1.5 Suportes poliméricos para geração de modelos *in vitro*

O desenvolvimento de equivalentes de pele faz parte de um conceito mais amplo: a engenharia de tecidos que, segundo o programa americano MATES (*Multi-Agency Tissue Engineering Science*), pode ser definido como “a ciência que usa processos físicos, químicos e biológicos e de engenharia para controlar e dirigir o comportamento coletivo das células”. No ano de 2007, o projeto MATES (Advancing, 2007) estabeleceu em um relatório os objetivos de área:

- Compreensão e controle da resposta celular;
- Formulação de suportes e ambiente matricial para crescimento de tecidos;
- Desenvolvimento de tecnologias industriais;
- Promoção de aumento de escala, transferência tecnológica e comercialização.

Dentre estes objetivos, o desenvolvimento dos suportes para o crescimento de células é um grande desafio, pois é preciso criar um ambiente que seja favorável para a adesão e crescimento celular visando o desenvolvimento do tecido.

Na busca de sistemas poliméricos inéditos que possam ser usados como suporte para crescimento celular é preciso considerar: (i) a biocompatibilidade do material, (ii) a inclusão de funções sinalizadoras de eventos acoplados ao desenvolvimento do tecido (morfológicas ou aditivos reguladores) e (iii) as diferentes características químicas da matriz de acordo com o tipo de tecido. Diversos materiais têm sido testados no desenvolvimento de tais suportes, tais como polímeros de ácido láctico (PLA), ácido glicolítico (PGA), fibroína de seda, poliuretano, policaprolactona (PCL), colágeno, gelatina, quitosana, seus copolímeros entre outros (Matthews *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Chakrapani *et al.*, 2012).

Atualmente, os equivalentes epidérmicos são desenvolvidos sobre diferentes tipos de suporte, entre eles matrizes semelhantes à derme com ou sem fibroblastos, suportes colagênicos ou simplesmente sobre um filtro inerte. (Mainzer *et al.*, 2014) As vantagens do uso das membranas biopolimérica como suporte celular estariam na redução de custo em relação aos modelos com suporte colagênico, estrutura comparável à arquitetura do tecido, biocompatibilidade com as células e possível aplicação em tecnologias mais avançadas como microchips fluídicos de pele (Abaci *et al.*, 2015).

O colágeno I é a proteína extracelular mais abundante em muitos tecidos, sendo um importante constituinte da derme. As fibras de colágeno nativas são formadas por repetições de uma estrutura tridimensional formada por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ (Matthews *et al.*, 2002). Estas fibras podem ser modificadas quanto à sua estrutura tridimensional, tipo e grau de ligações cruzadas e presença de outros componentes como fatores de crescimento. Além destas características que o tornam um potencial componente de suporte celular, o colágeno I é aprovado pela FDA (“*US Food and Drug Administration*”) para uso clínico, o que o torna um potencial componente de suportes biocompatíveis (Macneil, 2008). No entanto, devido ao baixo ponto de fusão e a rápida desnaturação, os processos de isolamento do colágeno e geração das membranas acabam por comprometer as propriedades estruturais e biológicas da proteína, o que pode se tornar uma desvantagem no uso do mesmo para geração de suportes celulares (Matthews *et al.*, 2002; Chakrapani *et al.*, 2012).

Um estudo de 48 diferentes tipos de biomateriais baseados em colágeno fibrilar, (Lammers *et al.*, 2009) demonstrou que, entre todas as condições testadas, a

presença de fibras de elastina nos filmes de colágeno estimula especificamente a proliferação de queratinócitos e não de fibroblastos. Chen e colegas (2005) desenvolveram uma malha híbrida de PLGA (poli(ácido DL-lático-co-glicólico) sintético) e colágeno natural sobre a qual foram cultivados fibroblastos. Eles observaram que nas malhas híbridas, os fibroblastos aderiam e cresciam melhor em relação à malha composta somente de PLGA. Além disso, a distribuição das células e por consequência, a secreção de matriz extracelular também se apresentaram mais homogêneas nas malhas contendo colágeno. Nestas malhas foi possível gerar uma estrutura dérmica após duas semanas, indicando que poderiam ser usadas na engenharia de tecidos.

Rho e colegas (2006) fizeram um estudo para avaliar a citocompatibilidade e comportamento celular de queratinócitos humanos plaqueados sobre uma matriz de colágeno I eletrofiado, conjugada ou não com proteínas da matriz extracelular (colágeno I, fibronectina e laminina). Ao contrário do esperado, o estudo demonstrou que a membrana eletrofiada (sem proteínas adsorvidas), teve menor adesão celular quando comparado à superfície de poliestireno da placa de 24 poços. Essa reduzida adesão, apesar da presença das fibras de colágeno, pode se dever ao fato de que durante a eletrofiação, ocorre desnaturação e *cross-linking* entre as moléculas de colágeno o que gera uma alteração na estrutura tridimensional da molécula e consequentemente nos sítios de reconhecimento dos receptores celulares. No entanto, observou-se que a adesão de moléculas de colágeno I e laminina, que são ligantes de integrina, sobre a membrana aumentou a adesão e o espalhamento celular em relação à membrana pura de colágeno (Rho *et al.*, 2006).

Para que um material polimérico possa ser usado como suporte para crescimento celular e geração de modelos de pele *in vitro*, é preciso que o mesmo apresente estrutura e função biológica comparável a das proteínas da matriz extracelular, ou seja, apresentar estrutura tridimensional que comporte adequadamente as células, ser biocompatível, permitir reduzido acúmulo de líquido e a permeação de nutrientes do meio de cultura (Rho *et al.*, 2006). Além disso, a associação à membrana de moléculas da derme, como o colágeno I ou laminina, pode contribuir para melhor adesão e desenvolvimento das células na fibra matricial (El Ghalbzouri e Ponec, 2004; Rho *et al.*, 2006).

1.5.1 Membranas biopoliméricas eletrofiadas

Uma das técnicas empregadas na fabricação de suportes poliméricos é a eletrofiação. Nesta técnica, um campo elétrico controla a formação de fibras (de 20 à 500 nm) e a deposição de polímeros a partir de uma solução extrusada por uma seringa (Huang *et al.*, 2003). O uso adequado do campo gera instabilidades no trajeto entre o orifício de saída da seringa e a base que criam um efeito “chicote” que permite a formação de uma malha não tecido (figura 7). A eletrofiação é uma técnica eficiente para produzir fibras de nano e micro diâmetros manipulando-se a concentração de polímeros e outros parâmetros. Essas membranas eletrofiadas apresentam alta razão área-volume o que lhes confere maior área de adesão celular, redução do acúmulo de líquidos e permeação de oxigênio (Kumbar *et al.*, 2008).

Figura 7: Esquema representativo da técnica de eletrofiação.

Fonte: Immich, 2013.

A fim de aproximar as membranas ao máximo da estrutura da matriz extracelular, é preciso pensar não somente nos aspectos físicos e estruturais, mas também na funcionalização da mesma. Há três processos que podem ser usados para funcionalização: adição de reagentes bioativos à solução de polímero, modificações na superfície após a eletrofiação e uso de técnicas de eletrofiação coaxial (pouco explorada)(Zhang *et al.*, 2005).

A eletrofiação de colágeno seria ideal como suporte para as células da epiderme humana, os queratinócitos, pois promoveria adesão celular, crescimento e

permitiria a penetração de células na fibra matricial, sem o inconveniente da contração do mesmo, observada quando essas células são plaqueadas sobre matriz colagênica, sem que esta proteína esteja ligada à uma malha ou outro suporte. No entanto, este processo de eletrofiação de colágeno puro solubilizado apenas em solvente é difícil devido a propriedades mecânicas inadequadas e à rápida degradação da proteína com perda de propriedades fundamentais (Chakrapani *et al.*, 2012). Uma alternativa que tem se apresentado a este problema é a eletrofiação com copolímeros (Truong *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Truong e colegas (2012) produziram um suporte de colágeno eletrofiado pela técnica de recobrimento de “camada por camada” sobre uma base polimérica sintética com colágeno nativo (ponto isoelétrico básico) misturado à colágeno modificado (ponto isoelétrico ácido). Os suportes desenvolvidos demonstraram não ter efeito citotóxicos e foram capazes de apresentar boa adesão de fibroblastos L929.

Burrows e colegas (2012) desenvolveram uma membrana biopolimérica construída a partir da eletrofiação de uma co-solução de politeraftalato de etila [PET - poly(ethylene terephthalate)] e colágeno tipo 1. Devido as suas propriedades mecânicas e considerável biocompatibilidade, o PET (figura 8) é muito utilizado como biomaterial na imobilização de células e biomacromoléculas, sendo que seu maior uso é na reconstrução cirúrgica arterial (Silver, 1994).

Figura 8: Estrutura química do PET.

Fonte: Wikipedia (2015).

A mistura de PET e colágeno constitui uma solução estável em HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) independentemente da razão PET/colágeno. No entanto, na eletrofiação, quanto maior a proporção de colágeno mais desigual é a distribuição de diâmetros das fibras e acima de 60% de colágeno o material se torna de difícil manipulação. No trabalho de Burrows e colegas as membranas com proporção PET:colágeno 1 80:20 (S_{8,2}) e 60:40(S_{6,4}) foram caracterizadas quanto as

propriedades químicas, mecânicas e biológicas. Para esta última, foram realizados ensaios de adesão, viabilidade e proliferação celular usando fibroblastos (3T3-L1) e HUVECs (*“human umbilical vein endothelial cells”*). As membranas demonstraram serem biocompatíveis permitindo crescimento celular e baixa perda de viabilidade. Ainda, a presença do colágeno I na membrana aumentou a taxa de proliferação dos fibroblastos cerca de quatro vezes e em nenhuma proporção houve indução de citotoxicidade.. A principal diferença observada entre as membranas foi quanto à distribuição das células, sendo que nas membranas S_{4,6} haviam áreas confluentes e áreas sem nenhuma densidade celular, enquanto que nas membranas S_{8,2} a distribuição celular mostrou-se mais uniforme (Burrows *et al.*, 2012).

Esta membrana apresenta-se como uma excelente opção de suporte para os mais diversos tipos celulares inclusive células epiteliais, como os queratinócitos. Considerando a manufatura do equivalente de epiderme, questiona-se se tal polímero (PET-Colágeno I) poderia ser utilizado em busca de mimetizar parcialmente a estrutura dérmica de suporte.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este projeto teve por objetivo sistematizar o protocolo de confecção de epiderme equivalente sobre membrana do tipo *transwell* (PET) e sobre membranas biopoliméricas (PET-COLÁGENO I) como potencial modelo para testes de avaliação de segurança e eficácia de fármacos, medicamentos, cosméticos, praguicidas e etc.

Uma vez que é importante que este equivalente de epiderme assemelhe-se o máximo possível à epiderme humana na situação *in vivo*, apresentando uma estrutura estratificada e diferenciada nós propusemos os seguintes objetivos específicos, como se seguem.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a qualidade dos queratinócitos humanos primários quanto aos parâmetros de diferenciação;
2. Gerar equivalentes de epiderme diferenciados sobre membrana *transwell* PET (Corning *Transwell*® Permeable Supports), que serão considerados controles;
3. Avaliar a utilização de membrana biopolimérica (PET-COLÁGENO I) sobre o *transwell* como suporte para o desenvolvimento do equivalente de epiderme;
4. Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos equivalentes de epiderme gerados;
5. Investigar a funcionalidade do modelo avaliando substâncias corrosivas e não corrosivas (2-bromo etilbenzeno (NC), benzilacetona (NC), ácido láctico (C) e ácido octanóico(C)) via MTT, segundo Guia 431 OECD (2013) e Torier et al, 2010.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento de células

As células utilizadas neste projeto foram isoladas a partir de amostras de pele provenientes de cirurgia de postectomia doadas com o consentimento do paciente ou responsável legal. A coleta da amostra e o isolamento e armazenamento das células no banco de células do laboratório de Citopatologia Clínica é realizado segundo o comitê de ética do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo CEPHU/USP 943/09, SISNEP CAAE 0062.0.198.000-9 (projeto: "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos", sob coordenação da Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler) (Anexo 9.2).

As amostras de pele obtidas nas cirurgias de postectomia são recebidas em frascos identificados contendo solução fisiológica (figura 9A). Estes frascos são mantidos em geladeira (4°C) até o momento do processamento, geralmente no mesmo dia da cirurgia. A primeira etapa é a esterilização rápida da amostra mergulhando-a em etanol 70% rapidamente (figura 9B), seguido de 03 mergulhos em tampão PBS contendo ampicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

O excesso de tecido adiposo e os vasos sanguíneos são removidos com auxílio de tesoura e pinças estéreis (figura 9C). Após a limpeza inicial, o tecido é fragmentado em porções de aproximadamente 9mm² e incubados em solução de dispase (3 a 5 mL), 4mg/mL (Roche) em PBS contendo antibióticos, por 12 horas a 4°C, com a porção dérmica voltada para o fundo da placa (35mm) e a porção epidérmica voltada para cima (figura 9D). A função da dispase é clivar o colágeno tipo IV que predomina na região da membrana basal que delimita a junção entre derme e epiderme (Waaijman *et al.*, 2010). Após 12 horas de incubação, adiciona-se soro fetal bovino (3 a 5 mL) a fim de parar a reação enzimática. Com auxílio de pinças estéreis, a epiderme é então destacada da derme, concluindo assim a primeira etapa para o isolamento dos 3 tipos celulares predominantes na pele humana (figura 9E).

Na sequência, a derme é incubada em uma solução de 1mg/mL de collagenase (Gibco) em PBS com antibióticos por 4 a 6 horas, à temperatura ambiente sob agitação e a epiderme é incubada em solução de tripsina 0,05% por 15 minutos em banho-maria à 37°C. Passado o período de incubação da epiderme, o frasco é agitado vigorosamente 3 vezes para desagregação celular, a ação da tripsina é então bloqueada pela adição de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular é centrifugada por 3 minutos à 1500g (adaptado de BROHEM et al, 2011) e o pellet ressuspenso em meio para cultivo de queratinócitos, previamente suplementado, em placas de cultura celular de diâmetro de 100mm recoberta por filme fino de colágeno IV (Sigma). Essa cultura é mantida em incubadora (Series II Water Jacket CO₂ Model 3100 – Thermo Scientific) à 7,5% de CO₂, 37°C por 6 horas para ancoramento celular, passado esse período o meio de cultura é trocado para remoção de células mortas.

Após a proliferação das células epiteliais e ganho de 60% confluência, o que ocorre em cerca de 1 semana, os melanócitos são retirados do co-cultivo com queratinócitos através de tripsinização seriada. Primeiramente realiza-se uma tripsinização rápida com tripsina 0,05% por 2 minutos à temperatura ambiente, o que promove a desadesão e coleta de melanócitos. Após centrifugação, o pellet contendo majoritariamente melanócitos é ressuspenso em meio de cultivo específico (Meio de melanócito M-254CF 500 – Invitrogen) para esse tipo celular e a cultura é então mantida mantida em incubadora à 5% de CO₂. Realiza-se então uma segunda tripsinização (tripsina 0,1% por 3 minutos à 37°C) na qual é coletado parte dos queratinócitos e alguns melanócitos remanescentes. Essas células são plaqueadas e identificadas para que novo isolamento seja realizado posteriormente. Por fim, uma terceira tripsinização é feita, com tripsina 0,1% por 3 a 4 minutos a 37°C, para coletar todos os queratinócitos que ainda permaneceram aderidos. Essa cultura pura de queratinócitos é mantidas em meio KGM Gold BulleKit (KBM-Gold Keratinocyte Basal Medium – Gold without Ca) suplementado com (KGM – Gold SingleQuot Kit) (Brohem et al., 2011) e isoproterenol (10⁻⁶ M) em incubadora à 7,5% de CO₂.

Essas culturas ultra-puras são então expandidas para ampliação do banco das células do laboratório (congeladas e mantidas em nitrogênio líquido) ou utilizadas para os experimentos.

Neste projeto foram utilizados queratinócitos e fibroblastos isolados a partir de 11 amostras de prepúcio doadas por pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, conforme disposto na tabela 2 e cujo processo de isolamento esta representado na figura 9.

Tabela 2: Lista de pacientes doadores de pele para isolamento de células.

Código	Idade	Cirurgia	Origem
#71	6a	12.07.2012	HU
#78	11a	12.10.2012	HU
#79	11a	17.10.2012	HU
#86	6a	03.07.2013	HU
#87	39a	18.09.2013	HC
#88	16a	04.12.2013	HC
#89	7a	23.04.2014	HC
#91	20a	17.09.2014	HC
#92	42a	01.10.2014	HC
#93	45a	15.10.2014	HC
#94	7a	05.11.2014	HU
#95	25a	05.11.2014	HC

Lista de pacientes doadores de pele de prepúcio removida em cirurgia de postectomia no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU) ou Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC). #XX=número de identificação da célula no banco de células do laboratório.

Figura 9: Isolamento das células da pele à partir de amostra de pele de prepúcio.

A. Prepúcio. B. Esterilização com etanol 70%. C. Limpeza. D. Fragmentação. E. Separação mecânica de derme e epiderme. Fonte: Banco de imagens Laboratório de Citopatologia Clínica, Universidade de São Paulo.

3.1.1 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células são cultivadas em placas de Petri descartáveis (100mm) contendo meio de crescimento normal específico para cada linhagem utilizada, em incubadora com atmosfera de CO₂ adequada para a manutenção de pH próximo ao fisiológico e especificado abaixo e temperatura de 37°C. Os queratinócitos são cultivados em atmosfera de 7,5% de CO₂ com meio KGM Gold BulleKit (KBM-Gold Keratinocyte Basal Medium – Gold without Ca) suplementado com (KGM – Gold SingleQuot Kit) (Brohem *et al.*, 2011) e isoproterenol (10⁻⁶ M). Os fibroblastos são cultivados em atmosfera de 5% com DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, previamente inativado (Gibco Invitrogen) e antibióticos (penicilina e estreptomicina).

O meio das placas foi trocado a cada 48 horas e as células foram subcultivadas quando atingiram, aproximadamente, 80% de confluência, utilizando, para tanto, tripsina 0,1% em PBS e tendo sido a cultura previamente lavada, uma vez, com solução de PBS A. Os estoques celulares são mantidos em meio de cultivo contendo 8% DMSO congeladas -196°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido (Brohem *et al.*, 2011).

3.1.2 Controle de qualidade das culturas primárias

Desde 2014, as células primária isoladas em nosso laboratório passaram a ser analisadas quanto à possíveis contaminações por agentes infecciosos via técnica de PCR. Isso é importante para garantir a pureza e qualidade das culturas, e para garantir a segurança ao manipulador. Nas figuras 10 e 11, abaixo, vemos um resultado representativo destas análises, neste teste especificamente foram analisadas células primárias oriundas dos pacientes #71, #77 (pool dos pacientes #77, #78, #79) e #88. Além de células utilizadas neste projeto, também foram avaliadas outras células do banco de células do laboratório de citopatologia (USP).

O RNA é extraído do sobrenadante das culturas através de kit de extração de RNA viral (Pure link® Viral RNA/DNA Mini Kit, Invitrogen) conforme instruções fornecidas pelo fabricante. As amostras de RNA são então encaminhadas para análise na Universidade Estadual de Maringá/PR pela equipe coordenada pela Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro. São realizados testes para detecção

de material genético proveniente de microrganismos 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 pesquisa-se a presença de fragmento correspondente à B-globina. A pesquisa para todos os microrganismos e HPV resultou negativa para todas as amostras testadas até o momento conforme figuras 10 e 11 abaixo. A partir deste primeiro resultado, todo o banco de células primárias do Laboratório de Citopatologia FCF-USP será avaliado, em parceria com a Dra. Márcia Consolaro, quanto à contaminação por esses microorganismos e também será incluído a análise de infecção por HIV.

Figura 10: Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para detecção de HPV por PCR em gel de agarose 1,5%.

M: marcador de 100pb. Legenda: CP: controle positivo de HPV; CN HPV: controle negativo de HPV; CN B-gI: controle negativo B-globina. 71 HPV: amostra 71 análise de HPV; 71 B-gI: amostra 71 análise de B-globina; 77 HPV: amostra 77 (pool pacientes 77, 78 e 79) análise de HPV; 77 B-gI: amostra 77 (pool pacientes 77, 78 e 79) análise de B-globina; 88 HPV: amostra 88 análise de HPV; 88 B-gI: amostra 88, análise de B-globina.

Figura 11: Análise eletroforética dos fragmentos amplificados para sete microrganismos usando PCR multiplex em gel de poliacrilamida 8%.

Todas as amostras foram negativas. Legenda: 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).

3.2 Determinação da curva de crescimento de queratinócitos

A fim de avaliar a capacidade proliferativa dos queratinócitos primários isolados de acordo com o número da passagem celular, número este que se refere à quantas vezes a célula foi dissociada do substrato por tripsina para subcultivo ou congelamento, foi gerada uma curva de crescimento celular. Queratinócitos provenientes do paciente 87 em passagem 2, 4 e 6 foram plaqueados em placa de 24 poços a uma concentração de 3×10^4 células/poço. Após 24, 48, 72 e 96 horas as células foram tripsinizadas e centrifugadas. Em seguida o sobrenadante foi descartado e os queratinócitos foram ressuspensos em PBS com solução de azul de tripan. O corante azul de tripan é capaz de atravessar membranas não integras, características de células inviáveis, resultando assim na marcação destas células em azul. Essa coloração de células por azul de tripan permite a contagem celular em câmara de Neubauer, diferenciando entre células viáveis e não viáveis. A curva de

crescimento e o tempo de dobramento (PDT; do inglês, *population doubling time*) foram determinados usando o software GraphPad Prism 5.0.

3.3 Geração e Preparo de Equivalente de Epiderme

Para confecção de equivalente epidérmico diferenciado, os queratinócitos humanos primários são plaqueados diretamente sobre suporte *transwell* (Corning *Transwell*® 3460 – Ø 12mm - poro 0,4µm) na densidade celular de $2,5 \times 10^5$ células/transwell em meio de cultura específico para queratinócitos e meio RAFT, específico para estímulo da diferenciação do epitélio na proporção 1:1. O meio de RAFT é preparado adicionando meio DMEM e meio Hams-F12 (proporção 3:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e suplementos (Toxina Colérica 10,1nM, Insulina 5µg/mL, Apo-Transferrina 5µg/mL, Hidrocortisona-21 hemisuccinate 0,4µg/mL, EGF (Epidermal Growth Factor) 0,5 ng/mL). As células são mantidas submersas nesta mistura de meio de queratinócitos e meio RAFT (1:1) por 24 horas para adesão celular. Após este período a montagem é transferida para uma interface ar-líquido (figura 12) e mantida com meio RAFT por 12 dias para a diferenciação da epiderme (Brohem *et al.*, 2011).

Figura 12: Esquema da geração do equivalente epidérmico.

3.3.1 Adequação de protocolo

O modelo de RHE EpiSkin™ é um dos modelos validados internacionalmente pela OECD para teste de corrosão cutânea. Neste modelo os queratinócitos são cultivados sobre um substrato de colágeno formado por uma membrana de colágeno tipo I e III recoberto com um filme de colágeno IV (Portes *et al.*, 2002; Alépée, Grandidier e Cotovio, 2014). Assim, visando melhorar a diferenciação epidérmica do

nosso modelo testamos o recobrimento do *transwell* com colágeno IV (40-80 μ L) (0,03mg/mL) e/ou colágeno I (80-200 μ L) (figura 13). O modelo RHE SkinEthic™ por sua vez não possui substrato de colágeno e ao invés de 12 dias, o tempo total para diferenciação epidérmica na interface ar líquido é de 17 dias (Tornier, Roquet e De Fraissinette, 2010; Molinari *et al.*, 2013). Assim essa condição também foi testada. Outros fatores apresentados em diversos artigos como possíveis promotores de diferenciação celular também foram testados, por exemplo, a adição de Ca⁺⁺ (Lamb e Ambler, 2013), meio condicionado de fibroblasto (meio D10 usado por fibroblastos (confluência de 50 à 80%) por 48 horas, e que contém metabólitos, fatores de crescimentos, proteínas de matriz extracelular, entre outros) (Holbrook e Hennings, 1983) e de TGF α (Abdel-Naser *et al.*, 2005). Além disso, testamos alterar a densidade celular de 2x10⁵ para até 5x10⁵ células/poço (Lamb e Ambler, 2013). Todas estas condições testadas estão resumidas na tabela 3.

Figura 13: Otimização do protocolo de geração do equivalente epidérmico.

A padronização do equivalente epidérmico foi desenvolvida em parceria com a aluna de Doutorado Tatiana Pedrosa do laboratório de citopatologia clínica USP. Desta forma, experimentos complementares foram realizados pela doutoranda Tatiana Pedrosa para verificar se ao substituir o SFB por meio condicionado de fibroblasto (meio D10 mantido em contato com cultura de fibroblastos por no 48 horas) no RAFT, adição de TGF α , aumento na concentração de EGF e exposição a ambiente com redução de umidade, seria possível melhorar o modelo de epiderme equivalente (condição 20 da tabela 3).

A fim de reduzir a umidade na incubadora (a partir do 9º dia na interface ar-líquido), os equivalentes epidérmicos foram transferidos para outra incubadora,

exclusiva para cultura dos modelos tridimensionais, na qual a bandeja de água (responsável por manter a umidade interna da incubadora) foi recoberta parcialmente por filme plástico.

Tabela 3: Tabela de condições testadas para otimização do protocolo de geração de epiderme equivalente.

condição	colágeno I (µl) [] mg/mL	colágeno IV (µl) (0,03 mg/mL)	tempo cultura submersa (dias)	tempo interface ar-líquido (dias)	concentração celular	Soro fetal bovino ^a (%)	[] de EGF ^a (ng/mL)	[] de CaCl ^a (mM)	[] de TGFα ^a (ng/mL)	Meio condicionado de fibroblasto ^a (%)
1	-----	-----	1	12	2,5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
2	-----	40	1	12	2,5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
3	200 (2,7)	-----	1	12	2,5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
4	200 (2,7)	40	1	12	5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
5	200 (2,7)	-----	1	12	2,5x10 ⁵	10	0,5	1,5	-----	-----
6	200 (2,7)	-----	1	12	4x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
7	200 (2,7)	-----	1	12	2x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
8	200 (2,7)	40	1	12	2x10 ⁵	10	0,5	1,5	-----	-----
9	200 (2,7)	40	1	12	4x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
10	200 (2,7)	40	1	12	2x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
11	80 (1)	-----	1	12	5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
12	-----	80	1	12	5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
13	80 (1)	80	1	12	5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
14	80 (1)	-----	2 ^b	12	5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
15	-----	80	2 ^b	12	5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
16	80 (1)	80	2 ^b	12	5x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
17 ^c	-----	300	1	17	16x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
18 ^c	600 (2)	-----	1	17	16x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
19 ^c	600 (2)	300	1	17	16x10 ⁵	10	0,5	-----	-----	-----
20 ^d	-----	80	1	12	2,5x10 ⁵	-----	1	-----	2	5

[] = concentração. a. Concentração final do RAFT. b. Primeiro dia submerso em meio de queratinócito KGMGold e segundo dia submerso em meio RAFT:KGMGold (1:1). c. Experimento realizado com *transwell* Corning *Transwell*® 3450 – Ø 24mm - poro 0,4µm). d. Neste experimento as peles foram mantidas 9 dias na interface ar-líquido normal (umidade normal) e 3 dias na interface ar-líquido com redução de umidade.

3.4 Geração e preparo de Pele Artificial

O equivalente dérmico é obtido mediante a mistura de fibroblastos, células predominantes na derme e colágeno tipo I. Os fibroblastos em monocamada (1,5

$\times 10^5$ células/derme) são coletados da placa de cultivo e ressuspensos em um volume de SFB igual 5% do volume total de equivalente dérmico a ser preparado. As células são acrescentadas a uma mistura composta de meio Ham's F12 10X (GibcoBRL, MD, USA) (10% do volume final de equivalente dérmico a ser preparado), um volume igual de tampão de reconstituição 10X (2,2% NaHCO_3 , NaOH 0,05M, HEPES 200mM) e colágeno tipo I comercial (3~4 mg/mL) (BD Biosciences, MA, USA) (750 microlitros por equivalente à ser preparado).

A solução de colágeno I contendo os fibroblastos é então transferida para placas de 24 poços (~0,8mL/poço) e mantidas em incubadora à 37°C por 15 a 30 minutos para polimerização do colágeno, resultando em um gel de colágeno com fibroblastos. Após a polimerização é adicionado 1mL de meio de RAFT por poço sobre os géis para normalização do pH. A placa é então mantida por cerca de 2 horas à 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 até a adição de queratinócitos primários humanos (Brohem *et al.*, 2011 modificado) conforme descrito à seguir.

Queratinócitos sub-confluentes são usados para a reconstrução da epiderme. Após normalização do pH, o meio de RAFT que recobria os equivalentes de derme em cada poço é removido e são plaqueados 2.5×10^5 queratinócitos/poço ressuspensos em um volume de total de 500 μL de meio (meio RAFT e meio para queratinócitos na proporção 1:1). Os queratinócitos são mantidos submersos neste meio em incubadora à 37°C, 5% de CO_2 para possibilitar a adesão celular por 24 horas. Após este tempo a montagem é transferida para uma grade de metal previamente esterilizada que garante a manutenção da interface ar-líquido. A pele é então cultivada utilizando meio de RAFT por 12 dias para a diferenciação e estratificação da epiderme (Brohem *et al.*, 2011).

Figura 14: Esquema de geração de pele artificial.

3.5 Testes de corrosão – OECD GUIA 431

O Guia 431 apresenta um ensaio que proporciona a identificação de substâncias e misturas químicas corrosivas ou não baseando-se em testes com modelos *in vitro*. O protocolo de ensaio pode também fornecer uma indicação da diferença entre corrosivos cutâneos graves e menos graves (subcategorização A, B e C). A substância a ser testada é aplicada topicamente na epiderme reconstruída e mantida por 3 minutos ou por 1 hora em experimentos separados (figura 15). O princípio do método baseia-se na premissa de que os produtos químicos corrosivos são capazes de penetrar o *stratum corneum* por difusão ou erosão, e são citotóxicos para as células subjacentes.

O *end point* primário para avaliação da ação de uma substância na pele é viabilidade celular uma vez que é conhecido que substâncias corrosivas causam efeitos citotóxicos após exposição à pele por curto tempo. Adicionalmente podem-se usar análises histológicas para verificar alterações morfológicas causadas pelo composto (Ceetox, 2009).

A viabilidade das células é medida pela conversão da desidrogenase do corante via ensaio de MTT como mencionado no item 3.5.1. Produtos químicos corrosivos são identificados pela sua capacidade de diminuir a viabilidade celular abaixo dos níveis de limiar definidos ($\leq 50\%$).

O guia da OECD 431 (OECD, 2014) apresenta uma lista com 30 substâncias de referência (24 se o modelo não for capaz de subcategorizar as substâncias corrosivas) a serem testadas para determinação de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e acurácia de métodos para testes de corrosão cutânea similares ou modificados a partir do teste base de referência RHE (descrito no Guia 431). Na tabela 4 é possível observar uma lista com as 4 substâncias escolhidas para esta fase inicial de avaliação do nosso modelo como teste para avaliação de corrosão cutânea. Os critérios para escolha foram: conformidade de resposta em relação ao estabelecido pelo guia da OECD 431 quando analisada em outros modelos de epiderme equivalente, disponibilidade, estado físico e capacidade ou não de reduzir o MTT. Além disso, foram utilizados como controle negativo e positivo uma solução salina (NaCl 0,9%) e ácido acético, respectivamente.

Tabela 4: Substâncias utilizadas para teste de corrosão (Guia 431 da OECD).

Substância	CASRN	Episkin™	SkinEthic™	Redutor de MTT	Estado físico
2-bromo etilbenzeno	103-63-9	NC	NC	Não	L
Benzilacetona	2550-26-7	NC	NC	Não	L
Ácido láctico	598-96-2	1B e 1C	1B e 1C	Não	L
Ácido octanóico	68937-75-7	1B e 1C	1B e 1C	Não	L

As substâncias estão listadas primeiramente como não corrosivas (NC) seguida das corrosivas, segundo a subcategorização (1A, 1B e 1C, graduação de mais corrosiva para menos corrosiva). (L: estado físico líquido).

3.5.1 Avaliação da toxicidade sobre Equivalente de Epiderme e Pele Reconstruída

A viabilidade celular dos equivalentes de epiderme e pele é avaliada pelo ensaio de MTT, que é baseado na redução do sal pelo sistema enzimático mitocondrial, através das atividades de desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, o qual reflete o normal funcionamento da mitocôndria e consequentemente a viabilidade celular (Mosmann, 1983). Em seguida ao tratamento e após lavagem com PBS, os equivalentes epidérmicos são transferidos para placa de 12 poços contendo 300µL por poço de uma solução de MTT em DMEM (1mg/mL) e as peles artificiais são transferidas para placa de 6 poços contendo 7mL por poço da solução de MTT (figura 15). As placas foram então incubadas por 3 horas, em incubadora à 5% de CO₂ ao abrigo da luz, para permitir a formação de formazan (precipitado), que posteriormente foi extraído com isopropanol. A absorbância de cada poço foi analisada através de leitor de microplaca, em 570nm. A viabilidade das substâncias e controle positivo foi dada pela razão entre a amostra e controle negativo multiplicado por 100 (OECD, 2013).

Figura 15: Esquema para realização do ensaio de corrosão (OECD, 2013).

3.6 Geração das membranas biopoliméricas

As membranas biopoliméricas foram geradas a partir de *pelletts* de PET (Politereftalato de Etila) e fibras de colágeno tipo I doados pelo laboratório do professor Luiz Henrique Catalani do Instituto de Química (Universidade de São Paulo) (Burrows *et al.*, 2012). As soluções são preparadas em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (concentração 15% - w/v), nas quais o soluto é uma mistura de PET:colágeno com razões de 40:60, 80:20 e 100:0. Após 96 horas sob agitação, 5 mL das soluções são eletrofiados no aparato de eletrofiação. A solução é colocada em uma seringa cujo movimento do êmbolo é controlado por um sistema hidráulico ligado a uma bomba de infusão (3mL/hora) (Cole Parmer) (figura 7). A agulha da seringa contendo o polímero (diâmetro = 0.84 mm) é conectada a uma fonte de alta voltagem (Glassman High Voltage, Inc., EH Series high-voltage) que fornece uma força de 25kV à solução deixando o sistema. Esta fibra de polímero que deixa a agulha é coletada por uma placa metálica ligada a um fio terra. Essa diferença de voltagem entre a solução deixando a agulha (25kV) e a fibra chegando na placa é que possibilita a formação da malha da membrana. Além disso, neste trajeto, devido ao baixo ponto de ebulição, o HFIP evapora e o jato vai se tornando

mais fino à medida que se aproxima da placa coletora (Buttafoco *et al.*, 2006). A distância adotada entre a ponta da agulha e a placa metálica coletora é fixada em 30 cm.

3.6.1 Esterilização das membranas biopoliméricas

Visando a eliminação de possíveis focos de contaminação sem alterar a estrutura das membranas biopoliméricas foram testados dois protocolos para esterilização. No primeiro protocolo testado as membranas foram deixadas por 24 horas submersas em álcool 70 (etanol absoluto diluído à 70% em água destilada) seguidas de 30 minutos de exposição à radiação UV (UV-C) em cada face das membranas. No segundo protocolo as membranas foram esterilizadas por irradiação gama (25kGy) utilizando o Irradiador Multipropósito 60-Co no Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN-CNEN/SP. Os dois protocolos foram então comparados através da análise de imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para tal, as amostras secas foram previamente recobertas com Au (2nm) e submetidas à análise em microscópio JEOL FESEM JSM-7401F na Central Analítica do Instituto de Química, na Universidade de São Paulo.

3.6.2 Geração de Equivalente de Epiderme e Pele sobre membrana biopolimérica

Após definição do protocolo ideal de esterilização das membranas (radiação gama) iniciou-se os ensaios de geração de equivalente epidérmico sobre as membranas biopolimérica de PET puro e PET com colágeno nas proporções 80:20 e 40:60. As condições testadas estão representadas na tabela 5. A condição 1 foi desenvolvida usando o meio RAFT do protocolo de geração de equivalente epidérmico conforme descrito no item 3.3, já os demais ensaios foram realizados usando o meio RAFT otimizado conforme item 3.3.1 – condição 20.

Tabela 5: Tabela de condições testadas para padronização de equivalente de epiderme e pele sobre membrana biopolimérica.

Condição	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Revestimento membrana	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Col. IV - 160µL	-----	-----
Meio de hidratação	D10	PBS	PBS	D10	D10	PBS	DMEM	DMEM	DMEM
Tempo	1 dia	4 horas	4 horas	1 hora	1 hora	4 horas	1 hora	1 dia	4 horas
Fibroblasto (n°cél/pele)/ volume de ressuspensão *	-----	1x10 ⁵ 200µl	-----	1x10 ⁵ 200µl	-----	1x10 ⁵ 80µL	-----	-----	-----
Tempo submerso	-----	1 dia	-----	1 dia	-----	7 dias **	-----	-----	-----
Queratinócitos (n°cél/pele)/ volume de ressuspensão	2,5x10 ⁵ 100µl	2,5x10 ⁵ 100µl	2,5x10 ⁵ 100µl	2,5x10 ⁵ 100µl	2,5x10 ⁵ 100µl	2,5x10 ⁵ 100µl	2,5x10 ⁵ 100µl	4x10 ⁵ 50µl	4x10 ⁵ 50µl
Tempo submerso	1 dia	1 dia	1 dia	1 dia	1 dia	1 dia	1 dia	1 dia	3 dias
Tempo interface ar-líquido úmida / e em umidade reduzida	12 - 0	9 - 3	9 - 3	9 - 3	0 - 12	11 - 3	11 - 3	18 - 3	18 - 3
Células	KP#87 (P3), KP#88 (P1)	FP#50 (P8), FP#81 (P6), FP#85 (P7), FP#86 (P4), KP#86 (P2), KP#88 (P2) KP#91 (P1)		FP#91 (P4), FP#92 (P1), KP#88 (P2), KP#89 (P1) KP#92 (P1 e P2)		FP#50 (P8), FP#85 (P7) FP#92 (P3) KP#87 (P2), KP#88 (P2) KP#89 (P2), KP#91 (P1)		KP#92 (P2), KP#94 (P1)	

Com base nos resultados das 9 condições testadas conforme descrito na tabela 5 e discutido no item 4.6 de Resultados e Discussões uma nova condições foi testada apenas com a membrana de PET:Colágeno 80:20. Neste experimento as membranas S_{8,2} foram hidratadas com agarose (40µL ou 80 µL) por 1 hora. A agarose foi então lavada com DMEM e em seguida foram adicionados 2,5x10⁵ queratinócitos por membrana ressuspensos em 80µL de meio. As membranas foram então mantidas 24 horas submersas em meio RAFT e meio queratinócitos (1:1) e após este tempo o *transwell* foi elevado à interface ar-líquido e mantido 9 dias na interface ar-líquido normal (umidade normal) e 3 dias na interface ar-líquido com redução de umidade (conforme descrito no item 3.3.1).

3.7 Controle da Qualidade Histológica dos Equivalentes de Epiderme e Pele Artificial

Os equivalentes de epiderme com ou sem o suporte biopolimérico, tratadas ou não com os compostos corrosivos bem como as peles artificiais foram fixados pó imersão em formalina tamponada 10% em PBS a 4°C por 4 horas, desidratadas em série crescente de alcoóis e embebidas em parafina histológica. Os blocos foram então cortados em secções de 7µm, coradas com Hematoxilina/Eosina e analisadas histologicamente quanto a sua morfologia (Brohem *et al.*, 2011; Tiago *et al.*, 2014).

Em alguns experimentos a amostra de pele (equivalente epidérmico ou pele artificial) foi cortada em duas partes, uma delas foi fixada com formalina e seguiu o procedimento descrito acima, e a outra metade foi incluída em OCT Tissue-Tek® (matriz para criocorte). As amostras incluídas em Tissue-Tek® foram mantidas a -80°C até o momento de corte em criostato (10µm). Estas lâminas foram deixadas 24 horas a temperatura ambiente e então conservadas à +4°C por até duas semanas a espera da realização do protocolo de imunofluorescência

3.8 Análise imunohistoquímica dos Equivalentes de Epiderme

Após a análise morfológica por coloração Hematoxilina-Eosina a epiderme equivalente desenvolvida foi analisada frente aos marcadores de diferenciação celular anticorpo anti-Queratina 10 (Abcam® ab1421) reativo à região de epitélio estratificado e altamente diferenciado e anticorpo anti-Queratina 14 (Abcam® ab7800) reativo à camada basal de proliferação e estratificação do epitélio (BROHEM, et al, 2011; PAGEON et al, 2008). Além disso, a proliferação celular na camada basal também foi caracterizada através do marcador ki67 (Bd6100968) que reconhece células em divisão. Também foram investigados os marcadores involucrina (Abcam®27495) (marcador da região suprabasal) e filagrina (Abcam24584) (marcador de diferenciação terminal).

As amostras incluídas em OCT Tissue-Tek® foram cortadas em micrótomo manual Leica com 10µm de espessura e mantidas por 24 horas à temperatura ambiente para adequada fixação dos cortes às lâminas. Após esse período, as lâminas são incubadas por 10 minutos em acetona (-20°C) para pós-fixação do

tecido, exceto para as lâminas cujo objetivo é investigar queratinas. Na sequência, as lâminas são secas à temperatura ambiente por 2 minutos e então hidratadas em PBS por 15 minutos. Após a hidratação, as lâminas são bloqueadas com solução de leite em pó desnatado (1%) em PBS por 10 minutos. Em seguida ao bloqueio com leite as amostras são permeabilizadas com Tween 20 (0,05%) em PBS. As amostras foram então incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com as soluções de anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse diluídos em solução de PBS + Tween 20 (0,05%) conforme descrito na tabela 6.

Tabela 6: Lista dos anticorpos primários utilizados nas imunomarcações.

Anticorpo Primário	Marca/Código	Diluição
Anti-citoqueratina 10 monoclonal (VIK-10) - <i>mouse</i>	Abcam - 1421	1:300
Anti-citoqueratina 14 monoclonal (LL002) - <i>mouse</i>	Abcam - 7800	1:300
Ki67 (policlonal) - <i>rabbit</i>	Bd - 6100968	1:100
Involucrina (policlonal) - <i>rabbit</i>	Abcam - 27495	1:100
Filagrina (policlonal) - <i>rabbit</i>	Abcam - 24584	1:100

Após 30 minutos de incubação com o anticorpo primário à temperatura ambiente em câmara úmida, as lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS + tween 20 (0,05%). Sobre os cortes foi adicionada a solução de anticorpo secundário Alexafluor® 488 (goat) anti-rabbit (Invitrogen a11034) para os anticorpos primários produzidos em rabbit e Alexafluor® 488 (goat) anti-mouse (Invitrogen a11001) para os anticorpos primários produzidos em mouse. O anticorpo secundário foi diluído em PBS + tween 20 (0,05%) (diluição 1:1000) e mantido sobre os cortes por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas 2 vezes com PBS + tween 20 (0,05%) e montadas com lamínula e meio de montagem Vectashield contendo DAPI (cora o núcleo em azul).

3.9 Análise Estatística dos dados

Os resultados de viabilidade celular foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, de no mínimo três experimentos isolados realizados em triplicata* (*especificado em cada experimento). Para os ensaios de corrosão, foi feita a comparação da viabilidade das amostras entre 3 minutos e 1 hora usando o programa Graph Pad InStat®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de crescimento de queratinócitos

Os equivalentes epidérmicos (EEs) são gerados utilizando queratinócitos primários humanos que estejam no máximo em passagem nº 4. Este procedimento é seguido a fim de garantir que os queratinócitos apresentem boa capacidade de proliferação, pois é sabido que células primárias se mantêm por períodos curtos em cultura celular antes de perderem suas características de células diferenciadas e seu potencial proliferativo. A figura 16 apresenta um gráfico com a curva de crescimento do queratinócito KP#87 em passagens nº 2, 4 e 6. Neste gráfico é possível observar que a placa de cultivo contendo queratinócitos em passagem nº 6 tem redução do número de células, não apresentando proliferação celular dentro do período de teste de 96 horas. Já nas células em passagens nº 4 e 2 o tempo de dobramento é de cerca de um 1 dia (31,67 e 28,41 horas, respectivamente). Demonstramos assim a importância em usar células primárias em baixa passagem na geração dos modelos de EEs e pele humana reconstruída a fim de garantir a qualidade das células quanto ao seu potencial proliferativo.

Figura 16: Gráfico da curva de crescimento do queratinócito KP#87 em passagens nº 2, 4 e 6.

Os resultados são apresentados como média de um experimento realizado em triplicata $\pm$ desvio padrão da média. Análise realizada pelo programa estatístico Graphpad Prism® 5.0.

4.2 Padronização do equivalente epidérmico

Nosso laboratório vem trabalhando no modelo de pele humana reconstruída nos últimos 10 anos e possui expertise na geração do modelo pele *fullthickness*. Com base no nosso protocolo de geração de pele reconstruída e em diversos artigos iniciou-se uma busca pela melhor condição para desenvolvimento de um modelo de epiderme equivalente que pudesse ser comparado à epiderme humana e que fosse correspondente aos modelos internacionais disponíveis comercialmente (figura 17).

Figura 17: Fotomicrografia da epiderme humana e dos modelos de epiderme *in vitro* SkinEthic, EpiSkin e Epiderm Tissue Model.

Fonte: EpiSkin, 2015; Mattek, 2015.

No primeiro ensaio de padronização do equivalente epidérmico foi testado o recobrimento ou não por gel de colágeno I e/ou filme de colágeno IV e a densidade celular (figura 18).

Figura 18: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana *transwell* quanto ao número de células e recobrimento por colágeno I e IV.

Equivalente epidérmico gerado a partir de queratinócitos KP#86 (Passagem nº 2). A) $2,5 \times 10^5$ células/poço (aumento 10x); B) $2,5 \times 10^5$ células/poço (aumento 20x); C) Filme de colágeno IV (40µL) e $2,5 \times 10^5$ células/poço (aumento 20x); D) Gel de colágeno I (200µL) e $2,5 \times 10^5$ células/poço (aumento 10x); E) Gel de colágeno I (200µL) com filme de colágeno IV (40µL) com 5×10^5 células/poço (aumento 10x); F) Gel de colágeno I (200µL) com filme de colágeno IV (40µL) com 5×10^5 células/poço (aumento 20x). Coloração Hematoxilina-Eosina.

O colágeno I é uma das principais proteínas da matriz extracelular da derme, que dá suporte ao desenvolvimento da epiderme (Matthews *et al.*, 2002). O colágeno IV é uma proteína constituinte da membrana basal, presente na junção derme-epiderme e é fundamental para a adesão, crescimento e diferenciação dos queratinócitos *in vivo* (Tinois *et al.*, 1991).

Deste primeiro teste não encontramos em nenhuma das condições uma amostra que apresentasse os quatro estratos da epiderme (basal, espinhoso, granuloso e córneo) bem delimitados. Em nenhuma das amostras observamos um estrato basal bem formado, caracterizado pela presença de núcleos justapostos e alinhados corados em azul na coloração por HE (figura 18). Pelas imagens das amostras D e E é possível perceber que o colágeno I se contrai de forma não uniforme gerando um aglomerado celular que não se assemelha à estrutura da epiderme humana nativa, mas sim a uma massa desordenada de células. A contração do colágeno acontece pelo arranjo das fibras durante a polimerização, além disso, Macneil (2008) afirma que células da pele, em especial os

queratinócitos, utilizam a enzima a lysyl oxidase, para ligar as fibras de colágeno entre si (cross-linking de colágeno) (Macneil, 2008). Apesar disso, na figura 18 F é possível perceber que houve a formação de uma camada córnea considerável, mais semelhante à epiderme humana. Este resultado indica uma possível contribuição conjunta do colágeno I e do colágeno IV para a diferenciação celular, porém também demonstra a não uniformidade de resposta devido à contração desordenada do colágeno I.

Neste ensaio não observamos também qualquer alteração na formação da estrutura epidérmica devido ao número de células inicial (queratinócitos plaqueados).

A fim de confirmar os resultados anteriores o ensaio foi repetido acrescentando ainda uma nova condição: adição ou não de cloreto de cálcio ao meio RAFT. O cálcio é importante em diversos processos de diferenciação, incluindo estratificação, adesão desmossomal e ativação de transglutaminase epidermal (Fuchs, 1990). A redução dos níveis de cálcio no meio reduz a estratificação dos queratinócitos, mas não altera a capacidade de divisão e crescimento das células (Watt, 1983). A ação deste íon está relacionada a mudanças na arquitetura da célula e não na expressão de genes em si (Fuchs, 1990). Na pele humana, há um gradiente de cálcio (menor para maior concentração das camadas viáveis de célula para o estrato granuloso) e um gradiente de pH (neutro na região das células viáveis e mais ácido no estrato córneo – pH 4,5-5,5) que são importantes para manter a homeostase da permeabilidade epidermal (Sun *et al.*, 2015).

Figura 19: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana *transwell* quanto ao número de células, recobrimento por colágeno I e IV e adição de CaCl_2 ao meio.

Equivalente epidérmico gerado a partir de queratinócitos KP#87 (Passagens nº 2 e 4). Todas as condições apresentadas foram tratadas com meio RAFT nas seguintes condições: A) RAFT com adição de CaCl_2 (1,5 mM), gel de colágeno I (200 μL) e 2×10^5 células/poço (aumento 10x); B) Apenas RAFT, gel de colágeno I (200 μL) e 4×10^5 células/poço (aumento 20x); C) Apenas RAFT, membrana de colágeno I (200 μL) e 2×10^5 células/poço (aumento 10x); D) RAFT com adição de CaCl_2 , gel de colágeno I (200 μL), filme de colágeno IV (40 μL) e 2×10^5 células/poço (aumento 10x); E) Apenas RAFT, gel de colágeno I (200 μL), filme de colágeno IV (40 μL) e 4×10^5 células/poço (aumento 10x); F) Apenas RAFT, gel de colágeno I (200 μL), filme de colágeno IV (40 μL) e 2×10^5 células/poço (aumento 20x). Coloração Hematoxilina-Eosina.

Ao observar os resultados representados na figura 19, observa-se mais uma vez que a junção do gel de colágeno I e do filme de colágeno IV como suporte para o crescimento de queratinócitos contribui para a diferenciação celular, uma vez que em todas as amostras com este tratamento obteve-se uma camada córnea (camada corada em rosa na figura 19). No entanto, percebe-se que apesar da melhora na estrutura e espessura das amostras ainda não há uma camada basal bem formada e semelhante a dos modelos comerciais como EpiSkin® (figura 19).

Apesar de ser citado por diversos pesquisadores como um importante íon em processos de estratificação celular a adição de cálcio por si só se mostrou insuficiente para melhorar a diferenciação dos queratinócitos (figura 19). Desta forma

este fator foi descartado para os ensaios seguintes de padronização do equivalente epidérmico.

Mais uma vez não foi possível notar diferença entre os EEs finais quanto à densidade celular por *transwell* no momento do plaqueamento, no entanto, como os modelos comerciais de epiderme equivalente, como EpiSkin® e SkinEthic®, usam maiores densidades celulares em seus modelos optou-se por seguir os ensaios de padronização com a concentração de $4 \text{ a } 5 \times 10^5$ células/*transwell*.

Na sequência testamos manter os queratinócitos submersos por 2 dias (1 dia em meio de queratinócito seguido de 1 dia em meio de queratinócito e RAFT 1:1) ao invés de 1 como no protocolo inicial antes da interface ar-líquido. O objetivo era verificar se desta forma conseguiríamos um estrato basal que se assemelhasse mais ou estrato basal da epiderme humana.

Figura 20: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana *transwell* quanto recobrimento por colágeno I e IV e tempo de cultura submersa. Equivalente epidérmico gerado a partir de queratinócitos KP#87 (Passagem n°3), KP#71, 78 e 79 (Passagem n°2). Todos os equivalentes epidérmicos foram construídos com 5×10^5 células/poço. A, C e E permaneceram 1 dia submerso em RAFT:meio de queratinócito (1:1); B, D e F permaneceram 1 dia submerso em meio de queratinócito e 1 dia submerso em RAFT:meio de queratinócito (1:1). A e B) Gel de colágeno I (80µL); C e D) Filme de colágeno IV (80µL); E e F) Gel de colágeno I (80µL) e filme de colágeno IV (80µL). Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 20x.

Ao compararmos os resultados apresentados na figura 20 percebe-se que não há diferença considerável entre as amostras nas duas condições.

Ainda, a fim de superar a contração do colágeno I, sem, no entanto, perder as características positivas atribuídas a sua associação com o colágeno IV, testamos substituir o gel de colágeno I espesso por um gel mais fino, semelhante ao filme de colágeno IV, recoberto então por filme de colágeno IV. O resultado é que houve diminuição da espessura do equivalente epidérmico obtido quando comparado ao resultado da figura 19 F, no entanto manteve-se um bom padrão de diferenciação e ainda um estrato basal mais organizado (figura 20 E e F).

Com base nos resultados anteriores conclui-se que a melhor condição seria representada pela figura 20 F: equivalentes epidérmicos gerados com 5×10^5 células/poço, 1 dia submerso em RAFT e meio de queratinócito (1:1) e *transwell* recoberto por gel de colágeno I (80 μ L) e filme de colágeno IV (80 μ L). Esta condição foi então repetida em um modelo de *transwell* com área superficial maior (cerca de quatro vezes a área do *transwell* tradicional) (figura 21).

Figura 21: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana *transwell* quanto ao tamanho do *transwell* e recobrimento por colágeno I e IV.

Equivalente epidérmico gerado a partir de queratinócitos KP#87 (Passagem n° 2), KP#88 (Passagens n° 1 e 3), KP#79 (Passagem n° 1) e KP#71 (Passagem n° 3). As epidermes foram cultivadas sobre *transwell* (área superficial 4,67 cm²) recoberto com filme de colágeno I e/ou IV com 160×10^4 células/poço. A) Filme de colágeno IV (300 μ L); B) Filme de colágeno I 0,2 mg/mL (600 μ L); C) Filme de colágeno I 0,2 mg/mL (600 μ L) com filme de colágeno IV (300 μ L). Aumento de 20 x. Coloração Hematoxilina-Eosina.

Pelos resultados apresentados na figura 21 percebe-se que o tamanho do suporte e consequentemente do equivalente gerado é indiferente para a estrutura e diferenciação das células.

Os ensaios de padronização realizados na sequência tiveram por objetivo verificar a influência de SFB, meio condicionado de fibroblasto, TGF- α , EGF e

condição de umidade na exposição à interface ar-líquido (Tese de doutoramento de Pedrosa, em elaboração).

O SFB é uma mistura complexa de proteínas que quando adicionada ao meio de cultura introduz elementos não definidos ao mesmo e isso pode levar a uma não uniformidade de resultados que dificilmente pode ser rastreada de forma específica (Keenan, Pearson e Clynes, 2006). Além disso, o soro de origem bovina pode conter agentes contaminantes, como *Mycoplasma sp*, vírus e o causador da encefalopatia esponjosa bovina (BSE) (Keenan, Pearson e Clynes, 2006; De Corte *et al.*, 2012). Já existem meios de cultura para queratinócitos em monocamada e para culturas tridimensionais livres de soro, a exemplo os meios “*Defined Keratinocyte Serum Free Medium (SFM)*” da GIBCO e o meio “*Keratinocyte 3D Medium (CnT-02-3D)*” produzidos pela CELLnTEC (Suíça). Ikeda e Ng (2011) demonstrarem ser possível gerar uma epiderme equivalente à humana sobre um equivalente dérmico usando meio de cultura de queratinócitos e meio de cultivo da pele livre de soro sem nenhum prejuízo ao correto desenvolvimento do modelo.

A interação entre fibroblastos e queratinócitos têm se mostrado importante na geração de peles equivalentes. Este efeito positivo pode ocorrer pela interação direta entre estas células ou pela sinalização através de fatores solúveis liberados por elas (figura 22). Além de promover a diferenciação dos queratinócitos, esses fatores solúveis secretados pelos fibroblastos induzem a expressão de uma variedade de proteínas da membrana basal, como laminina V, nidogenio e colágeno tipo IV e VII (El Ghalbzouri e Ponec, 2004; El Ghalbzouri *et al.*, 2005; Ng e Ikeda, 2011). Alguns trabalhos demonstram que os fibroblastos são capazes de liberar fatores solúveis no meio de cultura, como fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e outros fatores de crescimento ainda desconhecidos (figura 22), e que este meio com estes componentes, quando adicionados à cultura de queratinócitos, por si só já seriam suficientes para regular a proliferação e a diferenciação das células, sem a necessidade da cocultura dos dois tipos celular (El Ghalbzouri e Ponec, 2004).

Figura 22: Representação dos fatores solúveis liberados pelos fibroblastos que afetam a proliferação e diferenciação de queratinócitos.

GM-CSF: fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos; KGF: fator de crescimento de queratinócitos; TGF: fator de transformação do crescimento. Adaptado de (El Ghalbzouri e Poncet, 2004).

Ao substituir o SFB no meio RAFT pelo meio condicionado de fibroblasto nós conseguimos gerar um modelo de epiderme equivalente menos suscetível as variações intrinsecamente relacionadas à composição do soro e com estrato basal e córneo distintos, e cuja morfologia se assemelha à epiderme humana.

À adição de TGF- α ao meio RAFT em conjunto com o EGF promoveu uma melhora maior ainda no padrão de proliferação e diferenciação do equivalente epidérmico. O TGF- α está envolvido na migração de queratinócitos e nos eventos iniciais que controlam o balanço entre proliferação e diferenciação. Este fator de crescimento tem um papel importante em manter cessada a proliferação das células diferenciadas, no entanto sua ação não é suficiente para induzir as células à diferenciação (Fuchs, 1990).

Além dos fatores de crescimento presentes no meio de cultura, para que os queratinócitos possam se diferenciar e formar uma estrutura similar à epiderme humana é preciso expô-los a uma interface ar-líquido. Apesar de diferenciados, estes modelos de epiderme equivalente ainda são incapazes de formar uma barreira equivalente à pele. Mak e colegas (1990) demonstraram que ao reduzir a umidade da incubadora de cultura de aproximadamente 100% para 75% foi possível melhorar a função barreira dos equivalentes epidérmicos, independentemente do suporte celular usado. Eles puderam observar uma redução na perda de água

transepidermal, no entanto, nenhuma alteração morfológica foi notada. Sugere-se que o gradiente de água através das camadas da epiderme tenham uma forte influencia sobre a diferenciação das queratinócitos (Mak *et al.*, 1991). Em estudo semelhante, Nolte e colegas (1992) observaram que ao reduzir à umidade no cultivo dos queratinócitos em relação às culturas controles (de >90% de umidade para cerca de 50-60%) houve uma melhora da função barreira do estrato córneo, apesar de não ter sido observada nenhuma alteração clara na composição e conteúdo lipídico do estrato córneo. Resultado semelhante foi observado em trabalho de Sun e colegas (2015), no qual a redução de umidade de 100% para 50%, apesar de não ter resultado em alterações morfológicas visíveis do estrato córneo, foi possível observar por microscopia eletrônica de transmissão um aumento na densidade de corneodesmossomos na condição seca (50% de umidade), o que resulta em um estrato córneo mais coeso (semelhante à pele humana). Além disso, o nível de expressão gênica, das amostras mantidas 12 dias sob cultivo na condição seca mostrou um aumento progressivo da expressão de glucosilceramida sintase (importante fonte de lipídeos do estrato córneo), um aumento de 2,5 vezes na expressão de filagrina e o estímulo na expressão de dois reguladores de osmolaridade (TauT e SLC6A12). Semelhante à pele humana, o modelo gerado em condição seca por Sun e colegas (2015) apresentou um gradiente de Ca^{2+} com concentração decrescente do íon do estrato córneo até as camadas viáveis da epiderme.

Com base nestes questionamentos a cerca da importância da baixa umidade na promoção da diferenciação celular, testamos transferir as peles no 9º dia de cultura da interface ar-líquido para outra incubadora na qual a bandeja de água foi parcialmente recoberta com filme plástico visando a redução na umidade. Juntamente com os demais fatores apresentados anteriormente, pudemos perceber que esta mudança, nos 3 dias finais do cultivo, foi importante para geração de um modelo com estrato córneo espesso e melhora na função barreira (como demonstrado pelos ensaios de corrosão no item 4.3).

Assim, com base em todos estes ensaios de padronização, chegamos ao que foi considerado a protocolo ideal para geração do modelo de epiderme equivalente:

- Recobrimento do *transwell*: 80µL de solução de colágeno IV;
- Concentração celular: $2,5 \times 10^5$ células/*transwell*;

- Condição de cultivo: 1 dia em cultura submersa em meio RAFT e meio queratinócitos, 9 dias na interface ar-líquido normal e 3 dias na interface ar-líquido em incubadora com redução na umidade;
- Meio: RAFT é preparado adicionando meio DMEM e meio Hams-F12 (proporção 3:1) com 10% de meio condicionado de fibroblastos e suplementos: Toxina Colérica 10,1nM, Insulina 5µg/mL, Apo-Transferrina 5µg/mL, Hidrocortisona-21 hemisuccinate 0,4µg/mL, EGF (*Epidermal Growth Factor*) 1ng/mL e TGF-α (*Transforming growth factor α*) 2ng/mL. As células são mantidas submersas nesta mistura de meio de queratinócitos e meio RAFT (1:1) por 24 horas para adesão celular.

Este protocolo foi repetido pelo menos três vezes a fim de verificar a reprodutibilidade do modelo. A morfologia e a caracterização do modelo quanto aos parâmetros de proliferação e diferenciação podem ser verificados na figura 23.

Figura 23: Fotomicrografia do equivalente epidérmico desenvolvido no laboratório de Citopatologia Clínica da Universidade de São Paulo.

Equivalente epidérmicos gerados a partir de queratinócitos KP#89 (Passagem nº2), KP#92 (Passagem nº 2), KP#94 (Passagens nº 2 e 1) e KP#95 (Passagens nº 2 e 1). A) Análise histológica por coloração em HE (amostra em parafina); B, C, D, E e F) Análise de diferenciação do equivalente epidérmico por imunofluorescência (amostra criocongelada): B – queratina 10 (marcador suprabasal), C – queratina 14 (marcador basal e suprabasal), D – Ki67 (marcador de proliferação celular), E – filagrina (marcador de diferenciação terminal) e F – involucrina (marcador suprabasal). Aumento 20x.

É possível notar uma clara transição na morfologia da célula nos estratos consecutivos da epiderme. Observa-se que as células na camada basal apresentam uma forma oval (seta vermelha 1), que se diferenciam progressivamente em células achatadas, ausentes de núcleo e contendo grânulos de querato-hialina (seta vermelha 2) (figura 23 A) (Boelsma *et al.*, 2000). Tais grânulos são característicos do estrato granuloso, sendo que a ausência destes pode indicar uma diferenciação anormal dos queratinócitos (Lamb e Ambler, 2013). Semelhante ao modelo de epiderme equivalente EpiSkin™, nosso modelo apresenta células do estrato granuloso achatadas de forma compacta e contendo querato-hialina (seta vermelha 3) (Boelsma *et al.*, 2000).

A presença de marcadores específicos nos diferentes estágios da diferenciação dos queratinócitos, complementarmente à histologia, é um indicativo da correta estratificação da epiderme. A citoqueratina 14 (CK14), por exemplo, é expressa majoritariamente na camada basal do epitélio (seta vermelha CK14), em células indiferenciadas altamente proliferativas já a citoqueratina 10 (CK10) e a involucrina são expressas na camada suprabasal e estratos mais externos da epiderme (estrato espinhoso e granuloso), representando marcadores de diferenciação tardia do epitélio. Estes dois últimos marcadores são os primeiros a serem expressos quando a célula inicia seu processo de diferenciação (Fuchs, 1990; El Ghalbzouri *et al.*, 2005; Lamb e Ambler, 2013). Na figura 23 B é possível verificar a expressão de citoqueratina 10 na camada suprabasal (seta vermelha CK10), conforme observado na maioria dos modelos de epiderme equivalente e na pele humana (Boelsma *et al.*, 2000).

Os estratos mais diferenciados, por sua vez, podem ser identificados pelas proteínas associadas ao envelope córneo tais como a involucrina e a filagrina (Ng e Ikeda, 2011).

Na figura 23 F, apesar da marcação fraca, é possível observar que a involucrina está evidenciada sobretudo no estrato granuloso da epiderme (seta vermelha involucrina). Assim como observado no nosso modelo, a involucrina é expressa apenas no estrato granuloso, no entanto nos modelos de epiderme equivalente EpiSkin e SkinEthic, ela é expressa em toda a camada suprabasal, indicando uma expressão precoce desta proteína relacionada às possíveis alterações

na síntese de outros componentes do envelope córneo também (Boelsma *et al.*, 2000). Isso demonstra o bom desenvolvimento do nosso modelo.

A filagrina é uma proteína expressa no estrato granuloso na forma de profilagrina sendo a principal constituinte dos grânulos de querato-hialina. Nas fases finais de diferenciação esta proproteína é processada em múltiplos filamentos de filagrina que se ligam aos filamentos intermediários de queratina (Sandilands *et al.*, 2009). De acordo com o esperado (figura 23 E – seta vermelha filagrina) a filagrina foi detectada no estrato granuloso do equivalente epidérmico gerado, enfatizando assim a eficiência do processo de diferenciação dos queratinócitos.

Além da diferenciação celular, é possível caracterizar o equivalente epidérmico quanto a capacidade proliferativa das células do estrato basal usando o marcador ki67 (seta vermelha Ki67). A proteína ki-67 é expressa em todas as fases do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose) a não ser na fase G_0 (parada de ciclo) no qual não é expressa. Essa expressão apenas nas fases ativas da célula tornam o ki67 um excelente marcador para células em proliferação (Scholzen e Gerdes, 2000). Assim, ao observarmos a figura 23 D podemos observar a co-localização do DAPI (marcador de núcleo) com o ki67 em alguns pontos do estrato basal. Isto indica que os queratinócitos do estrato basal estão proliferando.

Para a geração de um modelo de epiderme equivalente que se assemelhe ao máximo à epiderme humana é preciso encontrar um balanço adequado entre proliferação e diferenciação (Boelsma *et al.*, 2000). Com base na análise morfológica e na adequada localização dos marcadores de diferenciação e proliferação podemos concluir que desenvolvemos um protocolo capaz gerar uma epiderme equivalente semelhante à humana.

4.3 Pré-validação do equivalente epidérmico: teste de corrosão (Guia 431 OECD)

Primeiramente, realizamos um ensaio de corrosão preliminar em nosso primeiro modelo de equivalente epidérmico (EE) (Apêndice 8.1). Após este ensaio piloto, realizamos o aprimoramento do protocolo de geração dos EEs e então novos experimentos foram necessários a fim de testar este novo modelo. O teste de escolha para avaliação de resposta do modelo foi o ensaio para avaliação de

potencial corrosivo de substâncias, segundo o Guia 431. Neste ensaio foram testados como padrões não corrosivos o 2-bromo etibenzeno e a benzilacetona e como padrões corrosivos o ácido láctico e o ácido octanóico. Além disso, solução salina (NaCl 0,9%) e ácido acético foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente.

A viabilidade dos equivalentes epidérmicos após 3 minutos e 1 hora de exposição às substâncias esta apresentado na tabela 7 e representado na figura 24.

Tabela 7: Viabilidade do equivalente epidérmico após ensaio de corrosão (Guia 431 OECD) e classificação prevista pela UM GHS/ EU CLP.

Substância	Viabilidade (% $\pm$ desvio padrão)		<i>p</i>	UN GHS <i>in vivo</i> classificação
	3 minutos	1 hora		
NaCl 0,9% (CN)	100,00	100,00	-----	NC
Acido Acético (CP)	1,21 $\pm$ 0,62	2,73 $\pm$ 1,81	0,031*	1A
2-bromo etilbenzeno	86,17 $\pm$ 16,68	81,57 $\pm$ 6,52 ^a	0,535	NC
Benzilacetona	84,09 $\pm$ 12,53	95,69 $\pm$ 10,09	0,055	NC
Acido Láctico	7,29 $\pm$ 2,30 ^a	1,42 $\pm$ 2,19	<0,001***	1B ou 1C
Acido Octanóico	7,09 $\pm$ 3,90	2,10 $\pm$ 0,63	0,003**	1B ou 1C

As substâncias foram testadas quanto à sua capacidade de corrosão segundo o Guia da OECD 431. A viabilidade das substâncias e controle positivo foi calculada como a razão entre a amostra e o controle negativo multiplicada por 100 (representada como porcentagem). CN: controle negativo, CP: Controle Positivo, NC: Não corrosivo, C: Corrosivo. Os resultados estão representados como média de no mínimo quatro experimentos feitos em duplicata e desvio padrão (^a experimento realizado em triplicata experimental e duplicata biológica). O valor de *p* para a comparação entre 3 minutos e 1 hora de cada grupo foi calculado usando o teste *t de Student*, sendo a significância mínima indicada por $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Análise realizada pelo programa estatístico Graphpad instat®.

Figura 24: Gráfico da viabilidade celular dos equivalentes de epiderme após ensaio de corrosão.

O Guia 431 apresenta dados de referência para classificação das substâncias em não corrosivas e corrosivas (categorias 1A, 1B ou 1C) quando testadas em modelos de equivalentes epidérmicos. Para os modelos comerciais EpiDermTMSCT e SkinEthicTMRHE, modelos estes que mais se assemelham ao desenvolvido no nosso laboratório, as substâncias são classificadas como não corrosivas se apresentarem viabilidade celular maior que **50%** para exposição por 3 minutos e maior que 15% para exposição de 1 hora (tabela 8). Nestes modelos, as substâncias são consideradas corrosivas se a viabilidade for menor que **15%** para 1 hora (tabela 8) (OECD, 2013). Ao comparar o resultado de viabilidade celular no nosso modelo de equivalente epidérmico após o teste de corrosão (tabela 7 e figura 24) vemos que nosso modelo respondeu conforme o esperado no que se refere às substâncias não corrosivas segundo o Guia 431. Porém, para as substâncias corrosivas, a classificação esperada para os ácidos láctico e octanóico seria 1B ou 1C, no entanto, com base na viabilidade do nosso modelo, essas substâncias seriam consideradas corrosivas na categoria 1A (viabilidade menor que 50% para 3 minutos de exposição).

Tabela 8: Tabela de classificação das substâncias segundo Guia do OECD 431 com base nos modelos de equivalente epidérmico EpiDermTMSCT e SkinEthicTMRHE. (OECD, 2013).

Viabilidade medida após 3 e 60 min	Predição à ser considerada
<50% após 3 min de exposição	Corrosivo: <ul style="list-style-type: none"> • Subcategoria opcional 1A
≥50% após 3 min de exposição E	Corrosivo:
<15% após 60 min de exposição	<ul style="list-style-type: none"> • Subcategorial opcional 1B e 1C
≥50% após 3 min de exposição E	Não corrosiva
≥15% após 60 min de exposição	

Esses resultados sugerem que o nosso modelo de equivalente epidérmico desenvolveu um estrato córneo capaz de proteger as células das camadas mais basais frente à exposição às substâncias, o que é corroborado pelas análises histológicas dos EEs após os tratamentos (figura 25).

	3 minutos	1 hora
Controle negativo NaCl 0,9 %	Viab.: 100%	Viab.: 100%
Controle Positivo Ácido Acético	Viab.: $1,21 \pm 0,62\%$	Viab.: $2,73 \pm 1,81\%$
2-Bromo etil benzeno	Viab.: $86,17 \pm 16,88\%$	Viab.: $81,57 \pm 6,52\%$
Benzilacetona	Viab.: $84,09 \pm 12,53\%$	Viab.: $95,69 \pm 10,09\%$
Ácido Láctico	Viab.: $7,29 \pm 2,3\%$	Viab.: $1,42 \pm 2,19\%$
Ácido Octanóico	Viab.: $7,01 \pm 3,9\%$	Viab.: $2,1 \pm 0,63\%$

Figura 25: Fotomicrografia de equivalente epidérmico após ensaio de corrosão (Guia 431- OECD). Equivalentes epidérmicos gerados a partir de queratinócitos KP#92 (Passagem nº 2), KP#93 (Passagem nº 2), KP#94 (Passagens nº 3, 2 e 1) e KP#95 (Passagens nº 3 e 1). Aumento de 20x.

Na figura 25 pode-se observar que os tratamentos com as substâncias não corrosivas não causaram alterações morfológicas evidentes em comparação ao controle negativo. Apenas o EE tratado com 2-bromoetilbenzeno por 1 hora apresentou a formação de pequenos vacúolos nas camadas viáveis. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez que as substâncias não corrosivas não causaram grande perda de viabilidade em relação ao controle negativo.

Ao analisarmos o EE tratado com ácido acético por 3 minutos observamos a maior desadesão celular no estrato córneo, observada pela presença de espaços intercelulares neste compartimento, possivelmente devido à ação do ácido acético sobre os corneodesmossomos resultando na perda de adesão entre os corneócitos. Após 1 hora de tratamento, este efeito no estrato córneo se repete e, além disso, podemos observar a perda do contato célula-célula também nos estratos intermediários da epiderme. Apesar disso a viabilidade celular medida via ensaio de MTT é significativamente maior após 1 hora de exposição ao ácido acético em relação ao tratamento de 3 minutos, fato este observado em todos os ensaios realizados. Alépée e colegas (2014) obtiveram resultado semelhante nos ensaios de corrosão realizados com o modelo EpiSkin™, no qual o ácido acético apresentou viabilidade maior após 1 hora de exposição em relação a exposição por 3 minutos. No entanto, na exposição da epiderme equivalente ao ácido acético por 4 horas (tempo adicional recomendado para o modelo EpiSkin™) a viabilidade é inferior à 1 hora de exposição, assemelhando-se à viabilidade após 3 minutos de contato do ácido com a epiderme (Alépée, Grandidier e Cotovio, 2014). Nós acreditamos que este fenômeno de maior viabilidade após exposição por maior tempo ao agente corrosivo em relação ao menor tempo de exposição possa ser comparado ao efeito hormesis. Hormesis é um efeito biológico caracterizado por efeitos opostos em altas e baixas doses de exposição (Calabrese 2001, apud Thong & Mailbach, 2008). Normalmente o mecanismo para esta resposta bifásica envolve a presença de diferentes receptores com diferentes afinidades em baixa e alta dose (Calabrese & Blain, 2005). No nosso exemplo, o fator determinante para a resposta celular seria o

tempo de exposição e não a dose, uma vez que em ambos os tempos, a mesma quantidade de ácido acético é aplicada. Assim, nós supomos que durante a exposição da epiderme equivalente ao ácido acético por 1 hora, as células do estrato basal ativariam mecanismos de recuperação que resultaria em maior viabilidade celular em comparação à exposição por três minutos, mesmo que esta ainda se mantenha baixa, como mecanismo de defesa e recuperação tecidual. Este fenômeno precisa ser mais bem investigado a fim de delinear os mecanismos envolvidos.

Ao analisar os resultados para o ácido láctico e ácido octanóico, percebe-se que a perda de viabilidade após 1 hora de tratamento em relação à exposição de 3 minutos tem efeito correspondente observado na histologia. Para o ácido láctico, após 3 minutos de exposição observa-se descamação do estrato córneo e após 1 hora de exposição, além da descamação do estrato córneo há vacuolização das camadas basais da epiderme.

A viabilidade celular do EE após 3 minutos de exposição ao ácido octanóico é de apenas 7,1% o que o classifica, segundo o Guia 431, como uma substância corrosiva. No entanto, ao observarmos a histologia correspondente nota-se que esta se assemelha ao controle negativo. Este resultado enfatiza a importância de analisar os efeitos de uma substância não apenas quanto à histologia, mas também por técnicas complementares como a viabilidade celular por MTT. No Guia 431 da OECD o padrão ouro de análise destes ensaios é a determinação da viabilidade por MTT. Nenhuma menção é feita sobre a necessidade de se analisar a morfologia das amostras após tratamento com as substâncias. No entanto, como pode ser visto pela figura 25, diferentes substâncias, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de ação sobre a epiderme e que talvez possam ser importantes para se entender o mecanismo de ação delas sobre a pele

Com base nestes resultados podemos concluir que nosso modelo de epiderme equivalente é capaz de distinguir substâncias com potencial corrosivo de não corrosivo, mas não é capaz de subcategorizar as substâncias corrosivas. No entanto, é importante considerarmos que o modelo EpiSkin™ prediction model, entre os 4 modelos validados pelo ECVAM, é o único indicado pela OECD para subcategorização das substâncias corrosivas. Ainda sim, cerca de 22% das substâncias da categoria corrosiva 1A na verdade fazem parte do grupo de

corrosivos 1B e 1C, de acordo com dados *in vivo*, indicando que mesmo este modelo já bem estabelecido pode demonstrar um maior potencial corrosivo da substância em questão do que o real. Para os modelos EpiDermTMSCT e SkinEthicTMRHE, modelos aos quais nos comparamos, esta porcentagem de substância “erroneamente” classificadas como 1A ao invés de 1B/1C é ainda maior, respectivamente 42% e 46% (OECD, 2013).

Sendo assim, mesmo que nosso modelo não tenha subclassificado as substâncias corrosivas conforme o esperado (1B/1C), é um modelo de grande importância no sentido de “ranquear” substâncias corrosivas de não corrosivas, não invalidando como modelo de avaliação de potencial corrosivo de substâncias. Neste ponto, é preciso continuar os ensaios de validação do modelo de EE com as demais substâncias listadas no guia 431 da OECD.

Além disso, a constante otimização do protocolo é necessária visando melhorar a função barreira do estrato córneo, o que se refletiria na maior proteção das camadas vivas da epiderme. A exemplo, o modelo de epiderme equivalente EpiSkin SNC é comercializado em duas “versões”, a primeira cultivada por 13 dias na interface ar-líquido é usada como modelo para testes de irritação (8-10 camadas de células vivas), a segunda, cultivada por 20 dias, é indicada para testes de penetração (7-8 camadas de células vivas). À medida que o equivalente epidérmico é mantido por mais tempo em cultura na interface ar-líquido, em condições ótimas de meio e condições de cultivo, as células da camada basal continuam a se proliferar e a se diferenciar.

Uma vez que não ocorre descamação nos modelos *in vitro*, assim como ocorre na pele humana, as camadas do estrato córneo se acumulam e assim este estrato se torna mais espesso com o passar do tempo. Quanto mais espessa a camada córnea mais protegida estarão as camadas basais da epiderme contra a ação de substância nocivas à pele. (Boelsma *et al.*, 2000) Esta pode ser uma razão pela qual nosso modelo foi capaz de distinguir substâncias corrosivas de não corrosivas, mas não foi capaz de classificar as corrosivas em moderadas ou extremas como determinado no Guia 431 (OECD, 2013).

4.4 Teste de corrosão do equivalente de pele humana reconstruída “full thickness”

O teste de corrosão é padronizado pela OECD no guia 431 para modelos de equivalente epidérmico. Como descrito anteriormente este teste foi aplicado no nosso modelo de EE como forma de pré-validação do modelo. Frente aos resultados promissores decidimos fazer um ensaio piloto e checar o potencial corrosivo das substâncias usando o equivalente de pele humana reconstruída “full thickness” gerado no laboratório à título de comparação e controle para os EEs. Neste ensaio piloto foi avaliada a viabilidade das peles após 1 hora de exposição às substâncias testes (tabela 9).

Tabela 9: Viabilidade para o equivalente de pele e de epiderme após ensaio de corrosão (1 hora).

Substância	Viabilidade 1 hora (%) Equivalente de Pele	Viabilidade 1 hora (%) Equivalente epidérmico	EpiDerm™ (classificação)	EpiSkin™ (classificação)
NaCl 0,9% (C-)	100,00	100,00	NC	NC
Acido Acético (C+)	11,22	2,73	1A	1A
2-bromo etilbenzeno	83,67	81,57	NC	NC
Benzilacetona	90,87	95,69	NC	NC
Ácido Lático	25,75	1,42	1B ou 1C	1B ou 1C
Ácido Octanóico	27,70	2,10	1B ou 1C	1B ou 1C

Para o equivalente de pele as substâncias foram testadas quanto a corrosão com base no Guia da OECD 431. Para o equivalente de epiderme, os dados de corrosão são referentes à tabela 7. A viabilidade das substâncias e controle positivo foi calculada como a razão entre a amostra e controle negativo vezes 100, sendo representada como porcentagem. CN: controle negativo, CP: Controle Positivo. Os resultados estão representados como % de viabilidade de um único experimento.

É possível observar que o modelo de pele equivalente apresenta viabilidade semelhante quanto às substâncias não corrosivas quando comparado ao modelo de epiderme equivalente. Já, quando olhamos para as substâncias corrosivas é possível observar que a que a viabilidade após 1 hora de tratamento para o modelo de pele equivalente é muito maior do que para a epiderme equivalente, indicando efeito protetor às células epidérmicas quando essas são cultivadas sobre o compartimento dérmico.

Se por um lado as substâncias não corrosivas nos dariam a ideia de que ambos os modelos apresentam função barreira semelhante, uma vez que o estrato córneo de ambos foi capaz de proteger de forma equiparável as camadas basais da epiderme, as substâncias corrosivas nos indicam o contrário. A maior viabilidade do equivalente de pele após a ação dos ácidos acético, láctico e octanóico pode estar relacionado à maior proteção do estrato córneo caracterizado por melhor função barreira. A função barreira é caracterizada por uma estrutura lamelar dos lipídios que se encontra na região extracelular entre os corneócitos (Madison, 2003). Assim, apesar da função barreira não estar exclusivamente relacionada à espessura do estrato córneo, o melhor desenvolvimento deste estrato, caracterizado por melhor padrão lipídico extracelular, somado a uma maior espessura lhe conferiria melhor função barreira que por consequência tornaria este modelo mais menos suscetível à ação de agentes nocivos (Pasonen-Seppanen *et al.*, 2001).

A análise histológica das amostras após o tratamento com as substâncias (figura 26) não mostra alterações evidentes nos estratos basais da epiderme, mas sobre tudo um efeito no estrato córneo. Quanto à derme, é possível notar que nos tratamentos com ácido acético e ácido láctico há uma perda da estrutura fibrilar característica do suporte colagênico relacionado à acidificação do meio, já que o colágeno tipo I, predominante nesta região é solubilizável em ácido. Este último aspecto demonstra que é preciso adequar o protocolo do ensaio de corrosão de forma a conter as substâncias de teste sobre a epiderme e evitar que excesso dessas substâncias transbordem para o meio e tenham um efeito sobre a derme diretamente, diferentemente do caminho esperado (estrato córneo → estratos basais → derme).

Figura 26: Fotomicrografia de equivalente de pele após ensaio de corrosão (baseado no Guia 431-OECD).

Equivalente de pele gerados a partir de queratinócitos FP#89 (Passagem nº 3), KP#88 (Passagem nº 2), KP#89 (Passagem nº 2). Aumento de 10x.

Ainda que na forma de um ensaio piloto, esses resultados preliminares demonstram que o modelo de epiderme equivalente é mais sensível do que o modelo de pele *full thickness*. No entanto, assim como apresentado no Guia de corrosão 431 e em artigos relacionados ao processo de validação dos testes de corrosão, questiona-se se a presença de um suporte dérmico seria necessária para classificação de substâncias quanto ao potencial corrosivo.

Apesar disso é importante destacar que ao remover o suporte dérmico perde-se a interação das células da epiderme, os queratinócitos, com as células da derme, os fibroblastos, e que tal interação talvez seja importante no processo de resposta à uma ação nociva contra a pele. Quanto mais semelhante um modelo *in vitro* for ao *in*

vivo, mais próximas da realidade estarão às respostas obtidas *in vitro*. Então, por mais que os modelos de equivalente epidérmicos sejam considerados suficientes para classificação de substâncias quanto ao potencial corrosivo, talvez apenas um modelo mais semelhante ao humano seja capaz de fornecer as respostas mais completas.

4.5 Efeito do processo de esterilização nas membranas biopoliméricas

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite estudar a superfície das membranas eletrofiadas. Através da comparação entre as fotos das membranas esterilizada pelos dois métodos (álcool e radiação UV ou radiação gama) é possível identificar o efeito dos tratamentos sobre o biopolímero.

A eletrofiação de PET, comumente pode gerar malhas eletrofiadas que apresentam uma morfologia com fibras e gotas como pode ser visto na figura 27. A presença das gotas se deve ao não estiramento completo do jato durante a eletrofiação, podendo ter sido ocasionado por diversos fatores como: 1) A presença de umidade na solução do polímero que pode ocasionar a hidrólise da cadeia polimérica e levar uma diminuição da massa molar do polímero e consequentemente da viscosidade da solução o que diminui o entrelaçamento das cadeias ou 2) a solução do polímero pode encontrar-se em um regime diluído no qual não foi alcançada a concentração crítica, que é a concentração na qual o entrelaçamento entre as cadeias é alcançado, condição indispensável para que ocorra o estiramento do jato. A formação das gotas também pode ser favorecida por um campo elétrico elevado que levaria a quebra das fibras sendo formadas (Buttafoco *et al.*, 2006). Uma consequência direta na obtenção de malhas eletrofiadas com a presença de gotas seria a variação no diâmetro das fibras, malhas eletrofiadas com presença de fibras e gotas apresentam diâmetro de fibra menor do que as fibras obtidas a partir de malhas eletrofiadas com ausência de gotas e esta variação no diâmetro das fibras influencia diretamente na distribuição do tamanho dos poros (BURROWS *et al.*, 2012).

Comparando-se os tratamentos de esterilização utilizados para as malhas eletrofiadas de PET, podemos verificar que o tratamento com etanol + UV ou

radiação gama não afeta morfologicamente a estrutura das fibras, e podemos observar que os materiais apresentam exatamente o mesmo diâmetro de fibra.

Para o tratamento com etanol 70%, não é possível perceber a presença de aglomerados de fibras, fato que pode ser justificado através do caráter hidrofóbico das cadeias de PET que são insolúveis neste solvente. Raios UV são iniciadores de cisões homolíticas de ligações, levando à formação de radicais, podendo levar a rupturas de cadeias, reações de reticulação ou reações de oxidação (Burrows *et al.*, 2012). No entanto, após o tratamento com álcool e UV, não foi observado nenhum desgaste à malha eletrofiada, não sendo observadas fibras rompidas ou aglomerações de fibras (figura 27 A).

O Tratamento por radiação gama não mostrou nenhum desgaste à malha eletrofiada. Portanto, verificou-se que para as malhas eletrofiadas de PET qualquer um dos tratamentos pode ser utilizado, sendo a presença de gotas resultante de um artefato da técnica de eletrofiação e não do método de esterilização (figura 27 B).

Figura 27: Efeito do tratamento de esterilização da membrana eletrofiada de PET.

* Controle: PET sem nenhum tratamento (Adaptado de Burrows *et al.*, 2012). A: Tratamento: álcool 24 horas + UV 1 hora. B: Tratamento: radiação gama. Aumento de 500 vezes.

As malhas eletrofiadas de PET/Colágeno 80:20 apresentam fibras de diâmetro uniforme. A malha como um todo apresenta uma única composição de fibra, que são as fibras de PET blendado ao colágeno, nestas fibras o colágeno está ligado ao PET a partir de ligações de hidrogênio, e este colágeno está distribuído uniformemente ao longo do material (Burrows *et al.*, 2012).

Colágeno blendado ao PET não é prontamente solúvel, e, portanto, o tratamento com etanol não leva à solubilização do colágeno. Podemos observar a partir das imagens A e B (figura 28) que a morfologia das fibras permanece

cilíndrica, não sendo observado aglomerados e/ou rupturas nas fibras, resíduos na superfície das fibras, ou alterações na distribuição de diâmetros dessas malhas. Portanto, ambos os métodos de esterilização podem ser utilizados, para a malha eletrofiada de PET/colágeno 80:20, ambas as malhas eletrofiadas obtidas após a esterilização por etanol e UV ou radiação gama são compatíveis com os resultados da literatura para a malha eletrofiada obtida nas mesmas condições.

Figura 28: Efeito do tratamento de esterilização da membrana eletrofiada de PET/colágeno 80:20.

* Controle: PET/Col 80:20 sem nenhum tratamento (Adaptado de Burrows *et al*, 2012). A e B: Tratamento: álcool 24 horas + UV 1 hora. C e D: Tratamento: radiação gama. A e C: aumento de 500 vezes, B e D: aumento de 2500 vezes.

As malhas eletrofiadas de PET/Colágeno 40:60, são malhas eletrofiadas híbridas constituídas de várias fase, ou fibras com diferentes composições, por isso estas malhas apresentam uma extensa variação de diâmetro. Estas malhas eletrofiadas apresentam desde fibras contendo apenas PET, como fibras apenas de colágeno, como fibras constituídas pela blenda do PET com colágeno, como fibras que são formadas por todos estes domínios (Burrows *et al.*, 2012).

Colágeno presente nesta malha pode ser acessado pelas células, em um biomaterial de forma diferenciada, uma vez que existe o colágeno prontamente solúvel presente nos domínios de puro colágeno, enquanto que o colágeno blendado ao PET vai sendo liberado mais lentamente do material.

Através das imagens de MEV obtidas, podemos observar nitidamente 2 aspectos característicos do desgaste da membrana após o tratamento com etanol seguido de UV, são eles 1) A presença de fibras com formas não cilíndricas (figura 29 B) provavelmente resultantes da solubilização de colágeno presente na superfície de fibras híbridas, e 2) Fibras que apresentam resíduos em sua superfície (figura 29 C), resíduos estes que são parte do colágeno solúvel que fica preso no entrelace tridimensional da malha eletrofiada. Na figura 29 A, podemos observar em menores magnitudes que as fibras da malha eletrofiada perdem seu formato cilíndrico característico observado na figura 29 D (tratada por radiação gama), apresentando-se em várias regiões na forma de um aglomerado de fibras. Portanto, podemos concluir que o tratamento com etanol e UV danifica a morfologia da malha eletrofiada, o que é causado porque parte do colágeno prontamente solúvel é removido por solubilização no etanol 70%.

A amostra quando tratada por radiação gama está semelhante ao que foi descrito por Burrows et al. (2012) para malhas eletrofiadas de PET/Colágeno 40:60, indicando que a esterilização ideal para estas malhas eletrofiadas em vista de sua aplicação como biomaterial seria a radiação gama.

Figura 29: Efeito do tratamento de esterilização da membrana eletrofiada de PET/colágeno 40:60.

* Controle: PET/Col 40:60 sem nenhum tratamento (Adaptado de Burrows *et al*, 2012). A, B e C: Tratamento: álcool 24 horas + UV 1 hora. D, E e F: Tratamento: radiação gama. A e D: aumento de 500 vezes, B e E: aumento de 2500 vezes, C e F: aumento de 5000 vezes.

4.6 Equivalente epidérmico sobre membrana biopolimérica

Conforme discutido nos resultados anteriores, a presença de um suporte dérmico aos queratinócitos da epiderme pareceu exercer papel positivo na resposta destas células aos testes de validação. Por isso passamos a investigar outros suportes que poderiam substituir o compartimento dérmico nesta função.

Burrows *et al.* (2013) testaram as membranas biopoliméricas como suporte para crescimento celular de HUVECs e fibroblastos. Os resultados com estas células indicaram que o material é biocompatível, permitindo a proliferação celular. Com base nestes resultados decidimos testar o crescimento dos queratinócitos sobre as membranas de PET e colágeno I. O objetivo era verificar se essas membranas seriam capazes de mimetizar a função da MEC e permitir não só a proliferação como também a diferenciação dos queratinócitos.

Figura 30: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana biopolimérica.

Condição: 1) Membranas hidratadas com D10 (1 dia); queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana, 1 dia em cultura submersa). Equivalentes epidérmicos (EE) foram então mantidos 12 dias na interface ar-líquido normal; 2) Membranas hidratadas com PBS (4 horas); fibroblastos (1×10^5 cél/membrana, 1 dia em cultura submersa) seguido da adição de queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana, 1 dia em cultura

submersa). EE foram então mantidos 9 dias na interface ar líquido em incubadora de cultivo comum e mais 3 dias em incubadora com baixa umidade; 3) Membranas hidratadas com PBS (4 horas); queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana, 1 dia em cultura submersa). EE foram então mantidos 9 dias na interface ar líquido em incubadora de cultivo comum e mais 3 dias em incubadora com baixa umidade; 4) Membranas hidratadas com D10 (1 hora); fibroblastos (1×10^5 cél/membrana em 200 μ L, 1 dia em cultura submersa) seguido da adição de queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana em 100 μ L, 1 dia em cultura submersa). EE foram então mantidos 9 dias na interface ar líquido em incubadora de cultivo comum e mais 3 dias em incubadora com baixa umidade; 5) Membranas hidratadas com D10 (1 hora); queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana em 100 μ L, 1 dia em cultura submersa). EE foram então mantidos 12 dias na interface ar-líquido com baixa umidade. Aumento de 20x.

Figura 31: Fotomicrografia de equivalente epidérmico. Padronização de diferenciação epidérmica sobre membrana biopolimérica.

Condição: 6) Membranas hidratadas com PBS (4 horas); fibroblastos (1×10^5 cél/membrana, 7 dia em cultura submersa – meio trocado diariamente) seguido da adição de queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana, 1 dia em cultura submersa). EE foram então mantidos 11 dias na interface ar líquido normal e 3 dias em incubadora com baixa umidade; 7) *Coating* de colágeno IV nas membranas ($160 \mu\text{L}$; 24 horas), neutralização do pH com DMEM (1 hora); queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana, 1 dia em cultura submersa). EE foram então mantidos 11 dias na interface ar líquido em incubadora de cultivo comum e mais 3 dias em incubadora com baixa umidade; 8) Membranas hidratadas com DMEM (1 dia); queratinócitos ($2,5 \times 10^5$ cél/membrana, 1 dia em cultura submersa). EE foram então mantidos 18 dias na interface ar líquido em incubadora de cultivo comum e mais 3 dias em incubadora com baixa umidade; 9) Membranas hidratadas com DMEM (4 horas); queratinócitos

(4×10^5 cél/membrana, 3 dias em cultura submersa). EE foram então mantidos 18 dias na interface ar líquido em incubadora de cultivo comum e mais 3 dias em interface ar-líquido em incubadora com baixa umidade. Aumento de 20x.

Nas figuras 30 e 31 estão representados os resultados das 9 condições experimentais testadas para geração do equivalente epidérmico sobre essas membranas biopoliméricas.

Na maioria das condições experimentais, em especial nas condições 1, 2, 7 e 9 é possível observar uma infiltração das células epidérmicas na estrutura tridimensional da malha polimérica. Este fenômeno já foi observado pela equipe do Dr. Zhang (2005) da Universidade de Singapura. Neste estudo os pesquisadores especulam que esta infiltração possa estar relacionada ao fato de que membranas hidrofílicas e com sinalizadores biológicos associados (colágeno I) se assemelham muito à estrutura e à função da matriz extracelular. Estas características facilitariam o transporte de nutrientes e metabolitos, promovendo a migração celular. Além disso, os pesquisadores destacam que, individualmente, as fibras que constituem as malhas são fracas, e isso, associado aos movimentos migratórios ameboides das células permite que estas adentrem os poros da malha e se expandam empurrando as fibras de menor diâmetro, ajustando assim o poro ao seu tamanho (Zhang *et al.*, 2005).

Mais do que a biocompatibilidade, esse poder de infiltração das células através da malha demonstra que a eletrofiação da solução de PET e colágeno cria uma membrana bioativa, na qual o colágeno agiria como sinalizador biológico associado ao PET. No entanto é importante destacar que o colágeno presente nas fibras das membranas biopoliméricas não é o mesmo de quando na sua estrutura natural. O processo de eletrofiação altera a estrutura tridimensional da proteína e consequentemente sua tendência natural de se organizar em fibras, seja pelo baixo pH (solução ácida) ou a pela temperatura (Buttafoco *et al.*, 2006). O colágeno, assim como outras proteínas de ligação da matriz extracelular, contém a sequência de tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que funciona como sitio para o reconhecimento celular através de receptores como as integrinas. A conformação desta sequência é fundamental para o reconhecimento específico nos receptores e, por consequência, adequada sinalização para migração e diferenciação celular.

Essa adesão favorável em presença de proteínas de membrana ilustra o princípio de que as células tendem a migrar para um ambiente que lhe seja mais favorável em termos de adesão celular, sem que, no entanto fiquem imobilizadas (Ruoslahti e Pierschbacher, 1987).

Além disso, a eletrofiação de colágeno usando HFIP (ácido) transforma colágeno em gelatina (Chen, 2010, apud Chakrapani, 2012). Tentando contornar este problema, Chakrapani e colegas (2012) substituíram o HFIP por uma solução de ácido acético (uma vez que a maioria dos processos de extração de colágeno usa como solvente o ácido acético) e policaprolactona (estabiliza a solução de colágeno em ácido acético). Como resultado, eles evitaram a desnaturação do colágeno durante a eletrofiação e geraram uma membrana com ótima capacidade de absorção de água, adequada porosidade e que poderia ser usada em engenharia de tecido.

Além da infiltração celular outro fenômeno observado nas membranas é a tendência das células de migrarem para o fundo do *transwell* e se desenvolverem sob a malha, chegando até mesmo a gerar uma estrutura muito semelhante à epiderme humana (condição 3 membrana S_{8,2}). Este fenômeno poderia estar ocorrendo justamente devido à capacidade migratória das células somada à porosidade das membranas que permitiriam que as células atravessassem as malhas e se aderissem ao fundo do transwell (condição 4 membrana de PET e membrana S_{8,2}). No entanto, durante este processo migratória seria de se esperar que algumas células aderissem nas fibras intermediárias e passassem a proliferar nesta região. Isto é justamente o que ocorre, por exemplo, na membrana de PET da condição 7 e na membrana S_{8,2} da condição 6. Assim, provavelmente o que estamos observando não seja um efeito migratório, mas sim um artefato da técnica que faz com que, ao adicionar as células sobre as membranas, algumas células vazem pelas laterais das malhas e acabem se aderindo ao fundo da placa.

A partir destes resultados é possível chegar a algumas conclusões. Primeiramente, a falta de uniformidade entre as membranas dificulta a reprodutibilidade dos resultados e isso, por sua vez, dificulta analisar se alterações pontuais no protocolo para geração do equivalente epidérmico representaram efetivamente alguma melhora. Segundo, a porosidade das membranas, sobre tudo das membranas contendo colágeno I, faz com que os queratinócitos adentrem na

malha o que impede que eles se organizem para formar uma estrutura epidérmica. Além disso, a umidade constante nas membranas pode alterar a eficiência da exposição da interface ar-líquido, fundamental para diferenciação dos queratinócitos.

Com base no trabalho de Powell e colegas (2008) pré-cultivamos fibroblastos na malha na tentativa de que eles pudessem migrar pela membrana e gerar uma matriz extracelular que se equiparasse à um equivalente dérmico. Sobre esta estrutura então foram adicionados os queratinócitos. No entanto como podemos observar pelos resultados das condições 2, 4 e 6 das figuras 30 e 31 esta alternativa também não possibilitou a geração do equivalente epidérmico.

Com base em todos os experimentos realizados e nas propriedades físicas das membranas, conclui-se que dentre as 3 membranas testadas a malha com 20% de colágeno era a mais promissora para novos ensaios. Esta membrana apresentou menor variabilidade em cada experimento individual e entre todas as condições testadas. Além disso, a presença de apenas 20% de colágeno se mostrou suficiente para tornar a membrana hidrofílica sem, no entanto, perder a resistência mecânica o que a tornaria mais frágil, como visto para a membrana com 60% de colágeno.

Visando diminuir a porosidade da membrana e reduzir as chances de adesão celular no fundo do *transwell* testamos recobrir a membrana S_{8,2} com solução de agarose 1,5% (figura 32). Pela primeira vez pudemos notar a formação de uma estrutura que se assemelharia ao equivalente epidérmico, como visto nas imagens B, C, e D da figura 32.

Figura 32: Fotomicrografia de equivalente epidérmico gerado sobre membrana biopolimérica de PET e colágeno tipo I (80:20).

Equivalente epidérmicos gerados a partir de queratinócitos KP#89 (Passagem nº2), KP#92 (Passagem nº 2), KP#94 (Passagens nº 2 e 1) e KP#95 (Passagens nº 2 e 1). Nas condições A, B e C primeiro foi colocada a membrana sobre o *transwell* e em seguida 40µL de agarose (1,5%); nas condições D, E e F primeiro foi adicionado 80 µL e em seguida a membrana S_{8,2} foi posicionado sobre a solução. Aumento de 20x.

No entanto, apesar de observarmos a clara formação de um estrato córneo nestas amostras percebe-se que os demais estratos da epiderme encontram-se desorganizados ou inexistentes. Não é possível identificar um estrato basal característico com a presença de queratinócitos arredondados e com núcleos evidentes bem como a diferenciação progressiva destas células. Além disso, mais uma vez verificamos a falta de reprodutibilidade dos resultados uma vez que para a mesma condição temos três resultados tão distintos (A, B e C).

Apesar das dificuldades enfrentadas, estes ensaios todos reforçaram que essas membranas são altamente compatíveis com as células, não apresentando toxicidade, assim como havia sido demonstrado por Burrows e colegas (2012). Os resultados são promissores e mostram a evolução no desenvolvimento da epiderme equivalente sobre as membranas. No entanto, para alcançarmos o nosso objetivo ainda seria necessário buscar algumas otimizações do protocolo de geração da epiderme equivalente sobre as membranas e até mesmo otimização do processo de fabricação das membranas.

5 CONCLUSÕES

Através dos ensaios de padronização nós fomos capazes de gerar um modelo de epiderme equivalente que se assemelha à epiderme humana e aos modelos comerciais disponíveis. O nosso modelo apresenta células distribuídas através dos quatro estratos da epiderme (basal, espinhoso, granuloso e córneo), com estrato córneo bem desenvolvido formado por mais de 10 camadas e cujo padrão de proliferação e diferenciação foi considerado adequado.

Os ensaios de pré-validação, de acordo com o Guia 431 da OECD, demonstraram o poder do nosso modelo como plataforma para testes avaliação de perfil corrosivo de substâncias, mesmo que este ainda não permita a subcategorização das substâncias corrosivas. Esses resultados demonstram a real possibilidade de disponibilizar kits nacionais para avaliação de eficácia e segurança de substâncias químicas e produtos.

A comparação dos resultados de viabilidade celular do ensaio de corrosão na pele equivalente e na epiderme equivalente demonstrou que este segundo modelo é mais sensível que o primeiro. No entanto, a simplicidade e menor custo para geração do equivalente epidérmico, assim como defendido pelos órgãos de validação internacionais, ainda fazem da Epiderme Equivalente o modelo ideal para tais ensaios.

A fim de aprimorar o modelo e desenvolver uma tecnologia inovadora, investimos nos testes de compatibilidade das células epidérmicas com suportes compostos por membranas poliméricas. Os testes de esterilização dessas membranas biopoliméricas (PET e colágeno I) permitiram estabelecer um protocolo ideal para esterilização das membranas que não gerasse alterações químicas nem físicas nas malhas. Esse procedimento potencialmente pode ser adotado para outros suportes. Apesar dos testes de geração de uma epiderme semelhante à humana sobre essas malhas não terem sido completamente satisfatórios, a biocompatibilidade do material com as células da pele demonstra o potencial destas membranas como suporte para cultivo celular e desenvolvimento de tecidos, não se limitando a estes tipos celulares.

5.1 Considerações Finais

Esse projeto foi muito significativo para nosso grupo visto que, além de ter resultado na implementação de um modelo de epiderme equivalente que pode ser utilizado para pesquisa e com potencial de validação como plataforma de avaliação de potencial corrosivo de substâncias, demonstrou a capacidade de se fazer ciência competitiva e de alta qualidade no Brasil. Hoje, graças aos nossos esforços, nós temos um modelo que, se receber os investimentos necessários, pode vir a se tornar o primeiro kit de equivalente epidérmico comercializado no território nacional e na América do Sul, o que significaria a independência em relação aos kits estrangeiros e o posicionamento ativo do Brasil não apenas no uso de métodos alternativos, mas também no desenvolvimento de novas tecnologias.

6 PRODUÇÃO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA

6.1 Apresentação da Produção Referente ao Projeto de Pesquisa em Congressos

- a) Artificial Skin in Perspective of Alternative Methods to Animal Experimentation in Brazil. Silvy Stuchi Maria-Engler, Ana Paula Immich, Andrea Costa Fruet, Bianca Ferruccio, 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 (Anexo 1).
- b) Participação no “9º World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences” (24 a 28 de Agosto, 2014) para apresentação de pôster e convite para sessão “Young Scientists Travel Award Short Presentations”.
- c) Reconstruction of Human Epidermis Equivalent as Platform for Skin Irritation Risk Assessment. Pedrosa TN¹, Catarino CM¹, Pennacchi PC¹, Barros SBM¹, Maria-Engler SS¹. II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences (Setembro 2014).

6.2 Colaborações em Projetos de Pesquisa

- a) Colaboração Interlaboratorial INMETRO.
- b) Aprovação do projeto RENAMA-CNPq, intitulado “Desenvolvimento de Plataforma de Pele Artificial para Avaliação de Segurança e Eficácia Pré-clínica de Substâncias Químicas”.

7 REFERÊNCIAS

ABACI, H.E.; GLEDHILL, K.; GUO, Z.; CHRISTIANO, AM.; SHULER, ML. Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents. **Lab on a Chip**, v.15, n.3, p.882-888, 2015.

ADVANCING tissue science and engineering: A multi-agency strategic plan by multi-agency tissue engineering science. Washington: MATES, 2007. 40p. Disponível em: http://tissueengineering.gov/advancing_tissue_science_&_engineering.pdf. Acesso em: 18 dez. 2012.

ALÉPÉE, N.; GRANDIDIER, M.H.; COTOVIO, J. Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin (TM) reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: revision of OECD test guideline 431. **Toxicology in Vitro**, v.28, n.2, p.131-145, 2014.

ASSELINÉAU, D.; BERNARD, B.A.; BAILLY, C.; DARMON, M.; PRUNIÉRAS, M. Human-epidermis reconstructed by culture - is it "normal"? **Journal of Investigative Dermatology**, v.86, n.2, p.181-186, 1986.

AUXENFANS, C.; FRADETTE, J.; LEQUEUX, C.; GERMAIN, L.; KINIKOGLU, B.; BECHETOILLE, N.; BRAYE, F.; AUGER, F.A.; DAMOUR, O. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed *in vitro* by tissue engineering. **European Journal of Dermatology**, v.19, n.2, p.107-113, 2009

ABDEL-NASER, M.B.; ABDALLAH, M.; ALMEIDA JR., H.L.; WOLLINA, U. Human skin cell culture and its impact on dermatology. **Egyptian Dermatology Online Journal**, v.1, n.2, p.1-25, 2005.

BAE, I.H.; PARK, J.W.; KIM, D.Y. Enhanced regenerative healing efficacy of a highly skin-permeable growth factor nanocomplex in a full-thickness excisional mouse wound model. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, n.1, p.4551-4567, 2014.

BALLS, M. The principles of humane experimental technique: timeless insights and unheeded warnings. **Altex-Alternatives to Animal Experimentation**, v.27, n.2, p.144-148, 2010.

BASKETTER, D.; DARLENSKI, R.; FLUHR, J.W. Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.21, n.4, p.191-202, 2008.

BELL, E.; SHER, S.; ULL, B.; MERRILL, C.; ROSEN, S.; CHAMSON, A.; ASSELINÉAU, D.; DUBERTRET, L.; COULOMB, B.; LAPIERE, C.; NUSGENS, B.; NEVEUX, Y. The reconstitution of living skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.81, n.1, suppl., p.2S-10S, 1983.

BERARD, F.; MARTY, J.P.; NICOLAS, J.F. Allergen penetration through the skin. **European Journal of Dermatology**, v.13, n.4, p.324-330, 2003.

- BOELSMA, E.; GIBBS, S.; FALLER, C.; PONEC, M. Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. **Acta Dermato-Venereologica**, v.80, n.2, p.82-88, 2000.
- BROHEM, C.A.; CARDEAL, L.B.; TIAGO, M.; SOENGAS, M.S.; BARROS, S.B.; MARIA-ENGLER, S.S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.24, n.1, p.35-50, 2011.
- BURROWS, M.C.; ZAMARION, V.M.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; SCHUCK, D.C.; TOMA, H.E.; CAMPA, A.; GARCIA, C.R.; CATALANI, L.H. Hybrid scaffolds built from PET and collagen as a model for vascular graft architecture. **Macromolecular Bioscience**, v.12, n.12, p.1660-1670, 2012.
- BUTTAFOCO, L. ; KOLKMAN, N.G.; ENGBERS-BUIJTENHUIJS, P.; POOT, A.A.; DIJKSTRA, P.J.; VERMES, I.; FEIJEN, J. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v.27, n.5, p.724-734, 2006.
- CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose response in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 202, n. 3, p. 289-301, 2005.
- CEETOX. Dermal Corrosion Services . Technical Brief - 2009. Disponível em: http://www.ceetox.com/uploads/3/2/5/2/3252052/1_dermal_corrosion_overview__7_2_2_10_2_p.pdf. Acesso em: 2 abr. 2015.
- CHAKRAPANI, V.Y.; GNANAMANI, A.; GIRIDEV, V.R.; MADHUSOOTHANAN, M.; SEKARAN, G. Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid. **Journal of Applied Polymer Science**, v.125, n.4, p.3221-3227, 2012.
- CHEN, G.P.; SATO T.; OHGUSHI H.; USHIDA T.; TATEISHI T.; TANAKA, J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. **Biomaterials**, v.26, n.15, p.2559-2566, 2005.
- CORSINI, E.; MITJANS, M.; GALBIATI, V.; LUCCHI, L.; GALLI, CL.; MARINOVICH, M. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. **Toxicology in Vitro**, v.23, n.5, p.789-796, 2009.
- DE CORTE, P.; VERWEEN, G.; VERBEKEN, G.; ROSE, T.; JENNES, S.; DE CONINCK, A.; ROSEEuw, D.; VANDERKELEN, A.; KETS, E.; HADDOW, D.; PIRNAY, J.P. Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: improved performance, usability, quality and safety. **Cell and Tissue Banking**, v.13, n.1, p.175-189, 2012.
- SANTOS, G.G.; REINDERS J.; OUWEHAND K.; RUSTEMEYER T.; SCHEPER R.J.; GIBBS S. Progress on the development of human *in vitro* dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.236, n.3, p.372-382, 2009.

EL GHALBZOURI, A.; JONKMAN, M.F.; DIJKMAN, R.; PONEC, M. Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v.124, n.1, p.79-86, 2005.

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

EPISKIN. Models. RHE/Human Epidermis. **RHE by Skin Ethic**. Disponível em: <http://www.episkin.com/RHE.asp>. Acesso em: 19 jan. 2015.

EUROPEAN UNION. **Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986**. On the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Disponível em: http://faolex.fao.org/cgi-bin/faolex.exe?rec_id=028723&database=faolex&search_type=link&table=result&lang=eng&format_name=@ERALL. Acesso em: 23 jan. 2015.

EUROPEAN REGULATION. Regulation (EC) n.1907/ 2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemical Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. **Official Journal of the European Union**, L396, 1-849, 2008. Disponível em: <http://www.reach-compliance.eu/greek/legislation/docs/launchers/launch-2006-1907-EC-06.html>. Acesso em: 23 jan. 2015.

FUCHS, E. Epidermal differentiation - the bare essentials. **Journal of Cell Biology**, v.111, n.6, p.2807-2814, 1990.

GIBBS, S.; VIETSCH, H.; MEIER, U.; PONEC, M. et al. Effect of skin barrier competence on SLS and water-induced IL-1 alpha expression. **Experimental Dermatology**, v.11, n.3, p.217-223, 2002.

HARDING, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 6-15, 2004.

HASSKARL, J.; VELUPILLAI, P.; MUNGER, K. Increased *in vitro* lifespan of primary human keratinocytes correlates with decreased migration. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, n.5, p.1179-1181, 2006.

HJS-CONSULTING. **Skin models and reconstructed skin**. Disponível em: <http://www.hjs-consulting.com/product-information/human-skin-models/>. Acesso em: 28 mar. 2015.

HOLBROOK, K.A.; HENNINGS, H. Phenotypic expression of epidermal cells *in vitro*: a review. **Journal of Investigative Dermatology**, v.81, p.11S-24S, 1983.

HUANG, Z.M. ; ZHANG, Y.-Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v.63, n.15, p.2223-2253, 2003.

IMMICH, A.P.S.; PENNACCHI, P.C.; MARIA-ENGLER, S.S.; BOEMO, R.L.; CATALANI, L.H. Artificial graft for eardrum regeneration. **Toxicological Sciences**, v.132, n.1, p.221, 2013. [Annual Meeting of the Society of Toxicology, 52., San Antonio, 2013 Termis - Tissue Engineering and Medicine Regenerative - Istambul, Turquia.

ISHIDA-YAMAMOTO, A.; IGAWA, S. The biology and regulation of corneodesmosomes. **Cell & Tissue Research**, 2014.

ITOH, M.; KIURU, M.; CAIRO, M.S.; CHRISTIANO, A.M. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.21, p.8797-8802, 2011.

KEENAN, J.; PEARSON, D.; CLYNES, M. The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. **Cytotechnology**, v.50, n.1-3, p.49-56, 2006.

KOIZUMI, H.; YASUI, C.; FUKAYA, T.; OHKAWARA, A.; UEDA, T. Beta-adrenergic stimulation induces intracellular CA⁺⁺ increase in human epidermal-keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v.96, n.2, p.234-237, 1991.

KUMBAR, S.G.; NUKAVARAPU, S.P.; JAMES, R.; NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v.29, n.30, p.4100-4107, 2008.

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

LAMMERS, G.; TJABRINGA, G.S.; SCHALKWIJK, J.; DAAMEN, W.F.; VAN KUPPEVELT, T.H. A molecularly defined array based on native fibrillar collagen for the assessment of skin tissue engineering biomaterials. **Biomaterials**, v.30, n.31, p.6213-6220, 2009.

LAW, S.; WERTZ, P.W.; SWARTZENDRUBER, D.C.; SQUIER, C.A. Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. **Archives of Oral Biology**, v.40, n.12, p.1085-1091, 1995.

LI, W.C.; GUO, R.; LAN, Y.; ZHANG, Y.; XUE, W.; ZHANG, Y. Preparation and properties of cellulose nanocrystals reinforced collagen composite films. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n.4, p.1131-1139, 2014.

MACNEIL, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. **Materials Today**, v.11, n.5, p.26-35, 2008.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: "La Raison d'Etre" of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, n.2, p.231-241, 2003.

MAINZER, C.; BARRICHELLO, C.; DEBRET, R.; REMOUÉ, N.; SIGAUDO-ROUSSEL, D.; SOMMER, P. Insulin-transferrin-selenium as an alternative to foetal serum for epidermal equivalents. **International Journal of Cosmetic Science**, v.36, n.5, p.427-435, 2014.

MAK, V.H.W.; CUMPSTONE, M.B.; KENNEDY, A.H.; HARMON, C.S.; GUY, R.H.; POTTS, R.O. Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. **Journal of Investigative Dermatology**, v.96, n.3, p.323-327, 1991.

MATTEK. **Skin corrosion (ecvam validated)**. Disponível em: <http://www.mattek.com/epiderm/applications/ecvam-skin-corrosion-test>. Acesso em: 28 mar. 2015.

MATTHEWS, J.A.; WNEK, G.E.; SIMPSON, D.G.; BOWLIN, G.L. Electrospinning of collagen nanofibers. **Biomacromolecules**, v.3, n.2, p.232-238, 2002.

MOLINARI, J.; ESKES, C.; ANDRES, E.; REMOUÉ, N.; SÁ-ROCHA, V.M.; HURTADO, S.P.; BARRICHELLO, C. Improved procedures for *in vitro* skin irritation testing of sticky and greasy natural botanicals. **Toxicology in Vitro**, v.27, n.1, p.441-450, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1/2, p.55-63, 1983.

NASCIMENTO, T.P. **Avaliação de efeitos imunossupressores da radiação UV em equivalente de epiderme imunocompetente**. São Paulo, 2013. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. [No prelo].

NG, W.; IKEDA, S. Standardized, Defined Serum-free Culture of a Human Skin Equivalent on Fibroblast-populated Collagen Scaffold. **Acta Dermato-Venereologica**, v.91, n.4, p.387-391, 2011.

NOLTE, C.J.M.; OLESON, M.A.; BILBO, P.R.; PARENTEAU, N.L. Development of a stratum-corneum and barrier function in an organotypic skin culture. **Archives of Dermatological Research**, v.285, n.8, p.466-474, 1993.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment**. Paris: OECD, 2005. 96p. (OECD Series on Testing and Assessment, n.34), 2005.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method**. Paris: OECD, 2013. 34p. (OECD Guideline for the testing of Chemicals, n.431). 2013.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. ***In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method**. Paris: OECD, 2014. 33p. (OECD Guideline for the testing of Chemicals, TG431), 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**. Paris: OECD, 2010a. 54p. (Series on Testing and Assessment, n.129), 2010a.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. ***In vitro* skin irritation: reconstructed human epidermis test method**. Paris: OECD, 2010b. 17p. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Draft Revised Guideline 439), 2010b.

PASONEN-SEPPANEN, S.; SUHONEN, T.M.; KIRJAVAINEN, M.; SUIHKO, E.; URTTI, A.; MIETTINEN, M.; HYTTINEN, M.; TAMMI, M.; TAMMI, R. Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier. **Histochemistry and Cell Biology**, v.116, n.4, p.287-297, 2001.

PENDARIES, V.; LE LAMER, M.; CAU, L.; HANSMANN, B.; MALAISSE, J.; KEZIC, S.; SERRE, G.; SIMON, M. I. In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification. **Cell Death & Disease**, v. 6, p. E1656-E1656, 2015.

PEPLOW, P.V.; CHATTERJEE, M.P. A review of the influence of growth factors and cytokines in *in vitro* human keratinocyte migration. **Cytokine**, v.62, n.1, p.1-21, 2013.

PEREIRA, R.F.; BARRIAS, C.C.; GRANJA, P.L.; BARTOLO, P.J. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, v.8, n.4, p.603-621, 2013.

PONEC, M.; BOELSMA, E.; GIBBS, S.; MOMMAAS, M. Characterization of reconstructed skin models. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v.15, suppl.1, p.4-17, 2002.

PORTES, P.; GRANDIDIER, M.H.; COHEN, C.; ROGUET, R. Refinement of the Episkin (R) protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. **Toxicology in Vitro**, v.16, n.6, p.765-770, 2002.

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

PRUNIERAS, M.; REGNIER, M.; WOODLEY, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. **Journal of Investigative Dermatology**, v.81, n.1, p.S28-S33, 1983.

RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes - formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, v.6, n.3, p.331-344, 1975.

RHO, K.S.; JEONG, L.; LEE, G.; SEO, B.M.; PARK, Y.J.; HONG, S.D.; ROH, S.; CHO, J.J.; PARK, W.H.; MIN, B.M. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. **Biomaterials**, v.27, n.8, p.1452-1461, 2006.

ROSSIGNOL, M.R. The 7th Amendment to the Cosmetic Directive. **Alternatives to laboratory animals : ATLA**, v.23 (suppl.1), p.19-20. 2005.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M.D. New perspectives in cell-adhesion - RGD and integrins. **Science**, v.238, n.4826, p.491-497, 1987.

SANDILANDS, A.; SUTHERLAND, C.; IRVINE, A. D.; MCLEAN, W. H. I.. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 9, p. 1285-1294, 2009.

São Paulo (Estado). Carolina Motter Catarino. Diário Oficial do Estado de São Paulo, v.124, n.16, 4 jan. 2014.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SIDRANSKY, E.; SHERER, D. M.; GINNS, E. L. Gaucher disease in the neonate - a distinct gaucher phenotype is analogous to a mouse model created by targeted disruption of the glucocerebrosidase gene. **Pediatric Research**, v. 32, n. 4, p. 494-498, 1992.

SILVER BOTANICALS. **Botanical-C sérum**. Disponível em: <http://silver-botanicals.com/botanical-c-serum.html>. Acesso em: 7 jul. 2014.

SILVER, F.H. **Biomaterials, medical devices, and tissue engineering**: integrated approach. London: Champman and Hall, 1994. 303p.

SIVAMANI, R.K.; LAM, S.T.; ISSEROFF, R.R. Beta adrenergic receptors in Keratinocytes. **Dermatologic Clinics**, v.25, n.4, p.643-653, 2007.

SPIEKSTRA, S.W.; TOEBACK, M.J.; SAMPAT-SARDJOEPERSAD, S.; VAN BEEK, P.J.; BOORSMA, D.M.; STOOF, T.J.; VON BLOMBERG, B.M.; SCHEPER, R.J.; BRUYNZEEL, D.P.; RUSTEMEYER, T.; GIBBS, S. Induction of cytokine (interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. **Experimental Dermatology**, v.14, n.2, p.109-116, 2005.

STW WORLD PRESS. **What is Your Skin Barrier?** Disponível em: <http://demo.stswp.com/cerave/resources/what-is-your-skin-barrier/>. Acesso em: 28 mar. 2015.

SUN, R.; CELLI, A.; CRUMRINE, D.; HUPE, M.; ADAME, L.C.; PENNYPACKER, S.D.; PARK, K.; UCHIDA, Y.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M.; ILIC, D.; MAURO, T.M. Lowered humidity produces human epidermal equivalents with enhanced barrier properties. **Tissue Engineering Part C-Methods**, v.21, n.1, p.15-22, 2015.

TAKAGI, R.; YAMATO, M.; MURAKAMI, D.; KONDO, M.; YANG, J.; OHKI, T.; NISHIDA, K.; KOHNO, C.; OKANO, T. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.5, n.4, p.E63-E73, 2011.

THONG, H.; MAIBACH, H. Hormesis [Biological effects of low level exposure (BELLE)] and dermatology. **Dose-Response**. v. 26, n. 4, p. 329-341, 2008.

TIAGO, M.; OLIVEIRA, E.M.; BROHEM, C.A.; PENNACCHI, P.C.; PAES, R.D.; HAGA, R.B.; CAMPA, A.; BARROS, S.B.M.; SMALLEY, K.S.; MARIA-ENGLER, S.S. Fibroblasts protect melanoma cells from the cytotoxic effects of doxorubicin. **Tissue Engineering Part A**, v.20, n.17/18, p.2412-2421, 2014.

TORNIER, C.; ROQUET, M.; DE FRAISSINETTE, A.D. Adaptation of the validated SkinEthic (TM) Reconstructed Human Epidermis (RHE) skin corrosion test method to 0.5 cm(2) tissue sample. **Toxicology in Vitro**, v.24, n.5, p.1379-1385, 2010.

TRUONG, Y.B.; GLATTAUER, V.; BRIGGS, K.L.; ZAPPE, S.; RAMSHAW, J.A. Collagen-based layer-by-layer coating on electrospun polymer scaffolds. **Biomaterials**, v.33, n.36, p.9198-9204, 2012.

WAAIJMAN, T.; BREETVELD, M.; ULRICH, M.; MIDDELKOOP, E.; SCHEPER, R.J.; 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, n.10, p.1339-1348, 2010.

WATT, F.M. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.81, n.1, p.S100-S103, 1983.

WIKIPEDIA. **Polyethylene terephthalate**. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_terephthalate. Acesso em: 9 mar. 2015.

WONG, T.; MCGRATH, J.A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. **British Journal of Dermatology**, v.156, n.6, p.1149-1155, 2007.

YA-XIAN, Z.; SUETAKE, T.; TAGAMI, H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin: Relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. **Archives of Dermatological Research**, v.291, n.10, p.555-559, 1999.

ZANONI, T.B. **Avaliação do perfil de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes Basic Red 51, Basic Yellow 57 e p-Fenilenodiamina usado na tintura de cabelo em células da pele**. Ribeirão Preto,

2014. 160p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

ZHANG, Y.Z.; VENUGOPAL, J.; HUANG, Z.M.; LIM, C.T.; RAMAKRISHNA, S. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. **Biomacromolecules**, v.6, n.5, p.2583-2589, 2005.

ZUANG, V.; BALLS, M.; BOTHAM, P.A.; COQUETTE, A.; CORSINI, E.; CURREN, R.D.; ELLIOTT, G.R.; FENTEM, J.H.; HEYLINGS, J.R.; LIEBSCH, M.; MEDINA, J.; ROGUET, R.; VAN DE SANDT, J.J.; WIEMANN, C.; WORTH, A.P. Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation - ECVAM Skin Irritation Task Force report 2. **Atla-Alternatives to Laboratory Animals**, v.30, n.1, p.109-129, 2002.

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice A - Ensaio de corrosão preliminar (Guia 431 OECD)

Neste ensaio preliminar haviam sido utilizadas como substâncias não corrosivas a benzilacetona e o ácido láurico. A benzilacetona apresentou um comportamento mais semelhante ao das substâncias corrosivas (figura 33 e tabela 10), o que contraria o estabelecido pelo Guia 431 da OECD. O ácido Láurico quando avaliado histologicamente também apresentou um efeito mais próximo do esperado das substâncias consideradas corrosivas (figura 33), mas os dados de viabilidade celular (tabela 10) indicam que a substância seria classificada como não corrosiva estando assim de acordo com os dados da OECD quanto a viabilidade via MTT. O ácido láurico é um pó e sua administração sobre o equivalente epidérmico para os testes de corrosão demonstrou ser difícil e aparentou falta de uniformidade na cobertura da pele. Esta dificuldade técnica juntamente com a discrepância entre os resultados de histologia e viabilidade via MTT motivaram a substituição do ácido láurico por outro agente não corrosivo também listado no Guia da OECD 431 (Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2005), 2013), o 2-bromo etil benzeno e aquisição de um novo frasco de benzilacetona.

O resultado da viabilidade celular dos equivalentes epidérmicos, após 17 dias de cultura (meio RAFT sem soro, com adição de 5% de meio condicionado de fibroblasto e TGF- α 1ng/mL), e aplicação por 3 minutos e 1 hora das substâncias está representado na tabela 10.

Tabela 10: Viabilidade para o equivalente epidérmico e classificação prevista pela UN GHS/ EU CLP.

Substância	Viabilidade (%)		UN GHS <i>in vitro</i> classificação
	3 min	1 h	
Água (CN)	100,00	100,00	NC
Ácido Acético (CP)	0,98	4,20	C
Benzilacetona	12,33	6,01	NC
Ácido Láurico	63,06	21,00	NC
Ácido Lático	2,95	2,86	C
Ácido Octanóico	1,87	1,59	C

As substâncias foram testadas quanto a corrosão segundo o Guia da OECD 431. A viabilidade das substâncias e controle positivo foi calculada como a razão entre a amostra e controle negativo vezes 100, sendo representada como porcentagem. CN: controle negativo, CP: Controle Positivo, NC: Não

corrosivo, C: Corrosivo. Os resultados estão representados como média de um experimento feito em triplicata.

Além da substituição ácido láurico pelo 2-fenil etilbromide, o ensaio passou a ser feito substituindo a água (controle negativo) por solução salina NaCl 0,9%, como indicado no Guia 431, por ser menos agressiva às células.

Figura 33: Fotomicrografia de equivalente epidérmico após primeiros ensaios de corrosão segundo Guia 431 OECD.

Equivalente epidérmico gerado a partir de queratinócitos KP#87 (Passagem 2) e KP#88 (Passagem 1). Aumento de 20x. Coloração Hematoxilina-Eosina.

8.2 Apêndice B - Colaboração Interlaboratorial INMETRO

O laboratório de biologia da Pele da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP participou de um projeto de colaboração interlaboratorial do INMETRO. Este projeto tinha como objetivo analisar a citotoxicidade de uma substância. Na sequência estes resultados seriam comparados com os dos demais laboratórios participantes.

O experimento foi executado seguindo o protocolo do guia da OECD 129, assim como descrito na sequência.

Materiais e métodos

- Código da amostra: CI001/2013/08;
- Substância de referencia: Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). CAS: 151-21-3. Sigma-aldrich (L6026);
- Solvente: Água;
- Célula: Cultura Primária de queratinócitos humanos (pacientes 79, 87 e 88);
- Meio de cultura KGM Gold BulleKit (KBM-Gold Keratinocyte Basal Medium – Gold without Ca);
- Ácido acético glacial (Merck K34527363);
- Neutral Red (Sigma N4638);

As células foram mantidas em frascos plásticos descartáveis contendo meio de crescimento adequado, e foram coletadas quando atingiram aproximadamente, 80% de densidade de saturação, utilizando, para tanto, tripsina 0,1% em PBS A (tampão fosfato salino contendo 1mM EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético, na ausência de cálcio e magnésio) tendo sido a cultura previamente lavada, uma vez, com solução de PBS. Uma suspensão celular de 2×10^4 células/mL em meio de cultura KBMGOLD. 125µL desta suspensão foram dispensado em cada poço de uma placa de 96 poços (controle e 8 concentrações teste em triplicata). As células foram cultivadas por 48 horas (37°C atmosfera úmida, 7,5% de CO₂), nas quais atingiram confluência de mais de 20%.

A substância teste e o SDS foram preparados em uma solução estoque 20 mg/mL em água. As oito concentrações da substância teste ou SDS foram obtidos pela diluição seriada em meio de cultura a partir da solução estoque (1:10, 1:100, 1:1000 etc).

Após o período de incubação, adicionei 125µL da concentração adequada da substância teste ou SDS ao meio de cultura com células já adicionado à placa. Então os queratinócitos com tratamento foram incubados por 48 horas. Após a incubação o meio da placa foi vertido e então lavado cuidadosamente com 250µL de PBS. Removido o PBS, adicionou-se 250 µL da solução de vermelho neutro em DMEM (25 µg/mL) e a placa foi incubada (37°C, atmosfera úmida, 7,5% de CO₂) por 3 horas. Após incubação, o meio foi removido, os poços lavados com 250µL de PBS e então 100µL de solução desorb (água:etanol:ácido acético glacial, 49:50:1) foram adicionados a cada poço. Seguidos os 20 min de agitação protegida da luz, a absorção de luz foi medida à 540nm (OD₅₄₀) usando o branco como referencia.

O valo de IC₅₀ foi calculado usando o programa GraphPad Prisma®.

Resultado

A tabela 11 apresenta os valores de IC₅₀ da substância teste e do SDS para os queratinócitos de número 79, 87 e 88.

Tabela 11: IC₅₀ de substância teste e SDS para queratinócitos 79, 87 e 88.

Amostra de célula	IC₅₀ Subs. Teste (µg/mL)	IC₅₀ SDS (µg/mL)
KP#79	88,58	120,5
KP#87	2,062	4,442
KP#87	9,379	10,82
KP#88	16,10	18,33

Os valores determinados de IC₅₀ tanto para a substância quanto para o SDS apresentaram muita discrepância entre as células dos três pacientes. O queratinócito KP79 apresentou valor de IC₅₀ muito maior que os demais tanto para o SDS quanto para a substância teste. Além disso, o valor de IC₅₀ também foi diferente quando o experimento foi repetido duas vezes com a mesma linhagem de célula (KP87). Essas discrepâncias podem indicar erro de procedimento mostrando assim a necessidade de repetição dos ensaios.

9 ANEXO

9.1 Informações para os Membros da Banca Julgadora de Mestrado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

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 arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir 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 arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição 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 arguição.

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, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

9.2 Comitê de ética

São Paulo, 15 de julho de 2013.

Il^{mo}(a). S^{ra}(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(a) Responsável:** Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler – **Equipe de Pesquisa:** Camila Eduardo Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos, Paula Comune Pennacchi, Paula Anastácia Ferreira, Fernanda Branco Filippin, Guilherme Galvão dos Santos, Renato Ramos Massaro, Bianca Ferruccio - **CEP-HU/USP:** 943/09 – **Registro CAAE:** 0062.0.198.000-09

Prezada Professora

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

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

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo - SP
Tel.: 3091-9457 – Fax: 3091-9479 - Email: cep@hu.usp.br

9.3 Currículo Lattes

27/03/2015

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Carolina Motter Catarino)

Carolina Motter Catarino

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7335153585405950>
Última atualização do currículo em 14/01/2015

Formanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Federal do Paraná. Realizou um intercâmbio acadêmico financiado pela CAPES na Universidade de Tecnologia de Compiègne, França e trabalhou como estagiária da L'Oréal em Paris. Atualmente cursa Mestrado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, área de Análises Clínicas, da Universidade de São Paulo, com o objetivo de desenvolver modelo tridimensional de epiderme humana. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Carolina Motter Catarino
Nome em citações bibliográficas CATARINO, C. M.; CATARINO, CAROLINA MOTTER

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2013 Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: DESENVOLVIMENTO DE EPIDERMIS EQUIVALENTE SOBRE MEMBRANA DO TIPO TRANSWELL E MEMBRANA BIOPOLIMÉRICA, Orientador: Silvy Stuchi Maria-Engler.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

2008 - 2013 Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.
com **período sanduíche** em Université de Technologie de Compiègne (Orientador: Paulo Fontoura).

2011 - 2012 Graduação em Engenharia de Biologia.
Université de Technologie de Compiègne.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Atuação Profissional

L'Oréal, L'ORÉAL, França.

Vínculo institucional

2012 - 2012 Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 35, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações L'Oréal em Paris.

Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4409068J0>

1/2

Áreas de atuação

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Francês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. TRUPPEL, JESSÉ HENRIQUE ; OTOMURA, FLAVIO ; TEODORO, UESLEI ; MASSAFERA, RUBENS ; COSTA-RIBEIRO, MAGDA CLARA VIEIRA DA ; **CATARINO, CAROLINA MOTTER** ; DALAGRANA, LUANA ; COSTA FERREIRA, MARIA EUGÊNIA MOREIRA ; THOMAZ-SOCCOL, VANETE . Can Equids Be a Reservoir of Leishmania braziliensis in Endemic Areas?. Plos One **JCR**, v. 9, p. e93731, 2014.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. In vitro skin corrosion as a pre-validation study of Reconstructed Human Epidermis in house developed. 2014. (Congresso).
2. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. In vitro skin corrosion as a pre-validation study of Reconstructed Human Epidermis in house developed. 2014. (Congresso).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 27/03/2015 às 21:22:30

9.4 Ficha do Aluno

30/03/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 8716225/1 - Carolina Motter Catarino

Email: carolinamcatarino@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 26/01/1990
Cédula de Identidade: RG - 7.788.948-5 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologista - Universidade Federal do Paraná - Paraná - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 24/06/2013
Início da Contagem de Prazo: 24/06/2013
Data Limite para o Depósito: 28/12/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 24/06/2013 até o presente. Email: silvy@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 24/06/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 14/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 24/06/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 30/03/2015 22:42:19

30/03/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 8716225/1 - Carolina Motter Catarino

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5753-3/1	Processos de Invasão Celular	05/08/2013	15/09/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	100	A	N	Concluída
BMI5863-7/2	Seminário Didático-Científico em Imunologia II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	15/08/2013	27/11/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5800-1/2	Patentes em Fármaco e Medicamentos	20/08/2013	21/10/2013	45	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5733-3/2	Ciências Farmacêuticas na Educação em Saúde	07/10/2013	20/10/2013	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5734-2/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	09/12/2013	15/12/2013	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5793-12/1	Tópicos em Análises Clínicas I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	100	A	N	Concluída
BMH5747-8/3	Tópicos Avançados em Biologia Celular e Tecidual I (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/03/2014	25/06/2014	60	4	95	A	N	Concluída
BMI5862-8/2	Seminário Didático-Científico em Imunologia I (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/03/2014	25/06/2014	60	4	95	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 30/03/2015 22:42:19